

**EINFLUSS VON CHOLESTATISCHEN LEBERERKRANKUNGEN UND
IMMUNSUPPRESSIVA AUF DIE MOLEKULARE EXPRESSION UND
FUNKTION HEPATOBILIÄRER TRANSPORTER**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biol. Ivo Meier-Wiedenbach
geboren am 03.10.1968 in Hannover

2004

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: PD Dr. med. Gabriele Kirchner
Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
Medizinische Hochschule Hannover

Prüfer im Hauptfach Biochemie: Prof. Dr. W. Müller
Prof. Dr. B. Otto

Prüfer im Nebenfach Immunologie: Prof. Dr. H. Holtmann

Tag der mündlichen Promotionsprüfung: 24.11.2004

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Meinen Dank möchte ich folgenden Personen aussprechen:

Bei Herrn Prof. Dr. M. P. Manns möchte ich mich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit bedanken, darüber hinaus für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Weiterbildung bei Vorträgen und Kongressen.

Bei Herrn PD Dr. W. Müller bedanke ich mich für sein starkes Interesse und die Betreuung der Arbeit von Seiten des Fachbereichs Biochemie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Gabriele Kirchner für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des vielschichtigen und faszinierenden Themas. Ich danke für den nötigen Freiraum bei bester Betreuung, für ihre stete Ansprechbarkeit in allen Phasen der Doktorandenzeit und ihren persönlichen Einsatz, der zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen hat.

Prof. Dr. Volkhard Kaever, Dr. Therese Koal, Annette Link und Ingelore Hackbarth vom Institut für Pharmakologie der MHH danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Hilfe bei den Messungen am SPE-HPLC-MS/MS.

PD Dr. U. Christians und Dr. Wolfgang Jacobsen, Department of Anesthesiology, University of Colorado Health Sciences Center, für die gute Kommunikation und Hilfe in der Probenbearbeitung.

Prof. Dr. Michael Ott danke ich für die freundliche Unterstützung durch Raum und Zeit, Dr. Andrea Jochheim und Dr. Ali Cieslak für ihre unermüdliche Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Auch den restlichen Kollegen am Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie sei an dieser Stelle für die nette, kommunikative und inspirierende Arbeitsatmosphäre gedankt:

PD Dr. T. Greten, Dipl. Biol. Tina Hillemann, Dipl. Biol. Annette Garbe, Konstantinos Jordanidis, Anke Gawol, PhD Student Amar Deep Sharma und Dr. Tobias Cantz.

Allen Arbeitnehmern und -gebern an den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe sei an dieser Stelle für die große Hilfe gedankt:

PD Dr. Ulrich Martin, Dr. Monica Winkler, Dr. Bettina Sohns, Dipl. Biochem. Ina Gruh, Dipl. Biol. Kristin Schwanke, Sandra Menke.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern und dem wichtigsten Menschen in meinem Leben: Christiane Ariza Romero

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY	I
ZUSAMMENFASSUNG	IV
KEYWORDS / SCHLAGWÖRTER	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 BILDUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER GALLE	1
1.2 DIE HEPATOBILIÄREN TRANSPORTER	2
1.2.1 Hepatobiliäre Transporter	2
1.2.2 ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter	3
1.2.3 Transporter der SLC-Familie	6
1.3 STÖRUNG DES HEPATOBILIÄREN TRANSPORTES	9
1.3.1 Definition der Cholestase	9
1.3.2 Hereditäre cholestatische Erkrankungen	9
1.3.3 Erworbene Störungen des Gallensäuren-Transportes	11
1.3.4 Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC)	11
1.4 IMMUNSUPPRESSIVE THERAPIE	13
1.4.2 Cholestase durch Immunsuppression	15
1.5 ZUSAMMENFASSUNG DER FRAGESTELLUNG	16
2. MATERIALIEN UND METHODEN	17
2.1 MATERIALIEN	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Kits	19
2.1.3 Marker	19
2.1.4 Puffer und Lösungen	20
2.1.5 Bakterienstämme und Zelllinien	20
2.1.6 Primer für die PCR	22
2.1.7 Sonden und Primer für die Real-Time PCR	23
2.2 METHODEN	25
2.2.1 RNA-Präparation	25
2.2.2 Analyse von Nukleinsäuren mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers	26
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.4 RT-PCR	28
2.2.5 Quantitative PCR	29
2.2.6 Interpretation der Daten	33
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese	36

Inhaltsverzeichnis

2.2.8 Bakterienkultur	36
2.2.9 Elektroporation von Plasmid-DNA	37
2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation	37
2.2.11 Zellkultur	38
2.2.12 Messung des Transports durch Monolayer mit Hilfe von Transwells	38
2.2.13 Quantifizierung von Immunsuppressiva	41
2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.2.15 Western Blot	44
2.2.16 Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Gelen	45
2.2.17 Ponceau-S-Färbung	45
2.2.18 Immunfärbung von Nitrozellulosemembranen	45
2.2.19 ECL-Färbung von Westernblots	46
2.2.20 Stripping und Reprobing von Westernblots	46
2.2.21 Immunhistologie	47
3. ERGEBNISSE	50
3.1 PCR-OPTIMIERUNG	50
3.1.1 Qualitätskontrolle der RNA	50
3.1.2 Quantifizierung von DNA im Bioanalyzer	51
3.1.3 Templatemenge	53
3.1.4 Optimierung von Temperatur und $MgCl_2$ -Konzentration	54
3.1.5 Reproduzierbarkeit	56
3.1.6 Linearität	57
3.2 EXPRESSION HEPATOBILIÄRER TRANSPORTER	59
3.2.1 mRNA-Expression von MRP3 und OATP-C bei Patienten mit PBC	59
3.2.2 Transporter-Expression bei Patienten mit PSC	60
3.2.3 Transporterregulation durch Parameter der Cholestase	63
3.2.4 Densitometrische Bestimmung von MRP2	64
3.2.5 Regulation auf Proteinebene	64
3.3 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	66
3.3.1 Expression und Lokalisation von MRP2	66
3.3.2 OATP-C und NTCP	72
3.3.3 Expressionsmuster hepatobiliärer Transporter bei PSC-Patienten	74
3.3.4 Veränderung der Transporterexpression durch Sirolimus	75
3.3.5 Regulation von MRP3 durch Sirolimus	76
3.4 TRANSPORT DURCH MONOLAYER IM TRANSWELL-SYSTEM	78
3.4.1 Funktion und Integrität der Monolayer	78
3.4.2 Transporterexpression in MDCKII-Wildtyp-Zellen	82
3.4.3 Bestimmung der TEER	84

Inhaltsverzeichnis

3.4.4 Kulturdauer und TEER.....	84
3.4.5 Temperaturabhängigkeit der TEER-Messungen.....	86
3.4.6 Messung der Substanzen im SPE-HPLC-MS/MS.....	87
3.4.7 Transport von Immunsuppressiva durch Monolayer.....	89
3.4.8 Transport von CsA, SRL und RAD durch MDR1.....	90
3.4.9 Berechnung von K_m und V_{max} für Ciclosporin.....	93
3.4.10 Transport von CsA, TRL, SRL und RAD durch MRP1.....	94
3.4.11 Transport von CsA, TRL, SRL und RAD durch MRP2 und MRP3.....	95
4. DISKUSSION	96
4.1 ANALYSE DIFFERENTIELLER GENEXPRESSION	96
4.1.1 Wahl der internen Kontrolle („Housekeeping Gen“).....	100
4.1.2 Optimierung der PCR.....	101
4.1.3 Reproduzierbarkeit	102
4.1.4 Berechnung der relativen Expression.....	102
4.1.5 Regulation von MRP3 und OATP-C bei Patienten mit PBC	103
4.1.6 Expression hepatobiliärer Transporter bei PSC	104
4.1.7 Korrelation von Expressionsstärke und Leberparametern.....	105
4.1.8 Regulation hepatischer Transporter.....	105
4.1.9 Expression und Lokalisation von MRP2.....	107
4.1.10 Regulation der Transporterexpression durch Sirolimus.....	109
4.2 TRANSPORTSTUDIEN MIT TRANSFIZIERTEN ZELLINIEN.....	111
4.2.1 Transepitheliale Resistenz (TEER).....	112
4.2.2 Messungen mit der SPE-HPLC-MS/MS.....	113
4.2.3 Transport von Immunsuppressiva durch Monolayer.....	114
4.2.4 Transport durch MDR1	115
4.2.5 Berechnung von V_{max} und K_m	117
4.2.6 Transport durch MRP1-Zellen.....	118
4.2.7 Transport durch MRP2 und MRP3.....	118
5. LITERATURVERZEICHNIS	121

SUMMARY

Several hepatobiliary transporters have been discovered and characterized in recent years. Some hereditary and acquired cholestatic liver diseases have been traced back to an impaired function of a hepatobiliary transporter. In the cholestatic liver disease primary biliary cirrhosis (PBC), an altered expression of hepatobiliary transporters has been described. But only few was known about the expression pattern in primary sclerosing cholangitis (PSC), a cholestatic liver disease, too. In this thesis it was examined, whether transporter expression is altered in PSC and if hepatobiliary transporters might participate in the pathogenesis of PSC.

In addition, hepatobiliary transporters play an important role in the interaction and oral bioavailability of drugs. It is known that Ciclosporin, Tacrolimus and Sirolimus can induce a cholestasis. Still it is not known, in which way these immunosuppressive drugs influence the function of the hepatobiliary transporters. Only some experiments have been done with Ciclosporin and Tacrolimus. Therefore, in this thesis the influence of Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus and Everolimus alone and in combination on hepatobiliary transporters was examined.

In explanted liver tissue of patients, who received a transplantation due to an advanced PBC or PSC, the expression of the export pumps MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 and BSEP and the uptake transporters NTCP and OATP-C was measured with Real-Time-Detection-PCR, Western blot and immunostaining, and compared to non-cholestatic controls. The influence of Sirolimus on mRNA expression of MRP2, MRP3, MRP6 and NTCP in HepG2 cells was examined, using Real-Time-Detection-PCR. Transport of Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus and Everolimus alone and in combination was determined using the Transwell system. To do this, MDR1-, MRP1-, MRP2- and MRP3-overexpressing MDCKII cells were used. The transport rate and the apparent permeability were calculated.

In PBC liver tissue, the mRNA of OATP-C and MRP3 was decreased. OATP-C was down to $50 \pm 42 \%$ and MRP3 to $46 \pm 23 \%$. In PSC liver tissue, the expression of BSEP was significantly higher ($259 \% \pm 59 \%$; $p < 0.005$), OATP-C significantly lower ($46 \% \pm 43 \%$; $p < 0.05$), but MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 and NTCP were unchanged. The relative mRNA expression of all transporters didn't show any correlation with the liver function parameters serum alkaline Phosphatase, Cholinesterase, γ -Glutamyltransferase and Bilirubin.

In Western blot, no significant changes could be showed: MDR3 and NTCP were unchanged, OATP-C and MRP2 were lowered (78 % bzw. 90 %) and BSEP was increased (117 %).

No significant differences in the quantity of MRP2, MRP6, NTCP and OATP-C could be seen in immunofluorescence-staining. But in one out of five PBC and four out of twelve PSC samples, the canalicular localization of MRP2 was altered: there was also strong staining for MRP2 in intracellular vesicles. MRP6, NTCP and OATP-C were unchanged in their localization.

Sirolimus induces MRP3 mRNA expression about 430 % of the controls. This effect diminished after 21 hours and mRNA level slowly dropped. After 26 hours incubation, MRP2 was increased to 159 % ($p < 0.01$) and MRP6 to 168 % ($p < 0.05$). NTCP expression was not affected.

In MDCKII wildtype cells the transport from the basal to the apical chamber was 3.2- (Ciclosporin), 3.0- (Tacrolimus), 3.8- (Everolimus) and 4.0- (Sirolimus) fold higher than in the opposite direction. The apparent permeability P_{app} for Ciclosporin, Everolimus, Sirolimus and Tacrolimus for the apical to basal transepithelial transport (AtoB) showed P_{app} -values of 4.7, 4.7, 4.9 and $8.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, respectively. The permeability P_{app} of the transport basal to apical (BtoA) for Ciclosporin, Everolimus, Sirolimus and Tacrolimus was 15.0, 18.1, 19.4 und $24.9 \cdot 10^{-6}$ cm/s, respectively.

The net flow (P_{app} BtoA - P_{app} AtoB) of Ciclosporin, Everolimus and Sirolimus in MDR1 transfected cells was higher than in the wildtype cells: fluxion of Ciclosporin was $19.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s (MDR1) to $10.6 \cdot 10^{-6}$ cm/s (WT), Everolimus showed fluxions of 26.0 (MDR1) and $14.7 \cdot 10^{-6}$ (WT) cm/s and Sirolimus of 28.6 (MDR1) and $15.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s (WT).

The P_{app} of 5 μ M Ciclosporin in MDCKII-MDR1 cells decreased in combination with 5 μ M Everolimus by 20 % and in combination with 5 μ M Sirolimus by 27 %. The transport of Everolimus and Sirolimus was inhibited in MDR1 and in WT cells: Sirolimus by 16 % (WT) and by 12 % (MDR1), Everolimus significantly by 49 % (WT) and 31 % (MDR1). The rate of transport (P_{app} BtoA/ P_{app} AtoB) was three- to sixfold higher in MDCKII-MDR1 cells compared to the wildtype. This reflects both, the lower AtoB and the higher BtoA transport in the MDCKII-MDR1 cells. The transport rate was not significantly influenced in wildtype cells by combinations of the substrate, in contrast to MDCKII-MDR1 cells, where combinations showed a lower transport rate than the substances alone. The K_m for the transport of

Ciclosporin in wildtype cells was 12 μM and 27 μM in MDR1 overexpressing cells, the V_{max} had values of 11110 $\text{pmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (WT) and 16670 $\text{pmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (MDR1).

The P_{app} of Everolimus and Tacrolimus showed no differences between wildtype and MRP1 overexpressing cells. The net flow of Ciclosporin (9.4 in WT and $6.0 \cdot 10^{-6}$ cm/s in MDCKII-MDR1 cells) and Sirolimus (11.5 and $6.1 \cdot 10^{-6}$ cm/s , respectively) was lower (6.0 to $9.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s for Ciclosporin and 6.1 to $11.5 \cdot 10^{-6}$ cm/s for Sirolimus). The transport rate in MRP1 overexpression cells was also lower: 2.5 (MRP1) to 3.2 (WT) for Ciclosporin and 2.7 (MRP1) to 3.9 (WT) for Sirolimus. Rates for Tacrolimus and Everolimus were unchanged (3.2 to 3.0 and 3.2 to 3.7).

Neither the transport rate nor the apparent permeability of 5 μM Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus and Everolimus showed significant differences in MDCKII-MRP2 and MDCKII-MRP3 cells, compared to the wildtype.

The observed differences are more probable due to adaptive mechanisms, than a part of the pathogenesis of PBC or PSC. Decreased expression of OATP-C could serve as a protecting mechanism for the hepatocyte by lowering the uptake of organic anions (e.g. bile salts). Increased expression of BSEP also protects the hepatocyte by higher export of bile salts into the bile. The altered localization of MRP2 represents an additional mechanism of bile flow regulation. Contrary results on mRNA and protein level could be due to existence of other regulating mechanisms.

Ciclosporin, Everolimus and Sirolimus are substrates of MDR1. It could be shown, that the MDR1 transport was inhibited, when combinations were used. This may result in an altered oral bioavailability, which should be considered in therapy when combinations are used. The data suggest, that Ciclosporin and Sirolimus are also substrates of MRP1. It was demonstrated, that Sirolimus induces MRP2, MRP3 and MRP6 in vitro. But it remains unclear, if this is a direct or indirect effect. The shown interactions support the hypothesis, that immunosuppressive drugs also induce cholestasis by impairing the hepatobiliary transporters.

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren sind mehrere hepatobiliäre Transporter entdeckt und charakterisiert worden. Einige hereditäre und erworbene cholestatische Lebererkrankungen konnten bereits auf die gestörte Funktion eines dieser hepatobiliären Transporter zurückgeführt werden. Bei der primär biliären Zirrhose (PBC), einer cholestatischen Lebererkrankung, wurde eine veränderte Expression hepatobiliärer Transporter beschrieben. Über das Expressionmuster bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), bei der es ebenfalls zu einer Cholestase kommt, war bisher wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bei der PSC eine veränderte Expression vorliegt und ob die hepatobiliären Transporter an der Pathogenese beteiligt sind.

Zusätzlich spielen hepatobiliäre Transporter bei Pharmakainteraktionen und der oralen Bioverfügbarkeit eine große Rolle. Es ist bekannt, dass die Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus eine Cholestase induzieren können. In welcher Weise diese Immunsuppressiva die Funktion der hepatobiliären Transporter beeinflussen, ist bisher nicht bzw. nur teilweise (für Ciclosporin und Tacrolimus) erforscht worden. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluß der Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus allein und vor allem in Kombination auf die hepatobiliären Transporter untersucht.

Im explantierten Lebergewebe von Patienten, welche aufgrund einer fortgeschrittenen PBC oder PSC eine Transplantation erhielten, wurde die Expression der Exportpumpen MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und BSEP und der Aufnahme-Transporter NTCP und OATP-C im Vergleich zu nicht-cholestatischen Kontrollen mittels Real-Time-Detection-PCR, Westernblot und Immunhistologien untersucht. Der Einfluß von Sirolimus auf die mRNA-Expression von MRP2, MRP3, MRP6 und NTCP wurde mittels Real-Time-Detection-PCR in HepG2-Zellen untersucht. Der Transport von Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus allein und in Kombination wurde im Transwell-Modell bestimmt. Hierzu wurden MDR1-, MRP1-, MRP2- und MRP3-überexprimierende MDCKII-Zelllinien verwendet.

Bei Patienten mit PBC waren die mRNA-Expressionen von OATP-C und MRP3 deutlich erniedrigt: OATP-C auf 50 ± 42 % und MRP3 auf 46 ± 23 % der Kontrollen. Im Lebergewebe von Patienten mit PSC war die Expression von BSEP signifikant erhöht (259 ± 59 %; $p < 0.005$), von OATP-C signifikant erniedrigt (46 ± 43 %; $p < 0.05$) und von MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und NTCP unverändert. Die relativen mRNA-Expressionen zeigten keine signifikanten Korrelationen mit den Serum-Cholestase-Parametern alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase und Bilirubin. Im Westernblot zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Protein-Expression: MDR3 und NTCP waren unverändert, OATP-C und MRP2 leicht erniedrigt (78 % bzw. 90 %) und BSEP leicht erhöht (117 %). In der Immunfluoreszenzfärbung konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen PBC-, PSC- und Kontroll-Lebergewebe für MRP2, MRP6, NTCP und OATP-C festgestellt werden. Bei einer von fünf PBC- und vier von zwölf PSC-Proben war der in der kanalikulären Membran der Hepatozyten lokalisierte Transporter MRP2 regional in intrazellulären Vesikeln konzentriert. MRP6, NTCP und OATP-C waren in den Patientenproben und Kontrollen unverändert in ihrer sinusoidalen Domäne exprimiert.

Sirolimus induzierte die Expression von MRP3 in HepG2-Zellen auf ca. 430 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt liess nach 21 h nach und die Expression ging leicht zurück. MRP2 wurde nach 26 h Inkubation auf 159 % ($p < 0.01$) und MRP6 auf 168 % ($p < 0.05$) hochreguliert. NTCP blieb unverändert.

In MDCKII Wildtyp-Zellen war der Transport aus der basalen Kammer in die apikale Kammer 3.2 (Ciclosporin), 3.0 (Tacrolimus), 3.8 (Everolimus) und 4.0 (Sirolimus) mal stärker als

umgekehrt. Die Permeabilitäten P_{app} für Ciclosporin, Everolimus, Sirolimus und Tacrolimus für den Transport von apikal nach basal (AtoB) zeigten P_{app} -Werte von 4.7, 4.7, 4.9 und $8.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Die Permeabilität des Transports von basal nach apikal (BtoA) betrug für Ciclosporin, Everolimus, Sirolimus und Tacrolimus 15.0, 18.1, 19.4 und $24.9 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

Die Netto-Permeabilitäten (P_{app} BtoA - P_{app} AtoB) von Ciclosporin, Everolimus und Sirolimus in MDR1-transfizierten Zellen waren deutlich höher als in Wildtyp-Zellen. Für Ciclosporin betrug die Netto-Permeabilität $19.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s (MDR1) zu $10.6 \cdot 10^{-6}$ cm/s (WT), für Everolimus 26.0 zu $14.7 \cdot 10^{-6}$ cm/s und für Sirolimus 28.6 zu $15.4 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

Die Permeabilität von 5 μ M Ciclosporin in MDCKII-MDR1 Zellen wurde durch Kombination mit 5 μ M Everolimus um 20 % und durch Kombination mit 5 μ M Sirolimus um 27 % vermindert. Der Transport von Everolimus bzw. Sirolimus wurde durch Ciclosporin sowohl in den WT-Zellen, als auch in den MDR1-überexprimierenden Zellen gehemmt: der Transport von Sirolimus wurde um 16 % (WT) bzw. 12 % (MDR1) gemindert; der Transport von Everolimus wurde noch stärker durch die Anwesenheit von Ciclosporin beeinflusst: der P_{app} -Wert sank signifikant auf 51 % (WT) bzw. 69 % (MDR1). Die Rate (P_{app} BtoA/ P_{app} AtoB) war in MDCKII-MDR1 Zellen drei- bis sechsmal höher als im WT. Dieses spiegelt sowohl den verringerten AtoB-Transport, als auch den höheren BtoA Transport der MDCKII-MDR1-Zellen wider. Die Rate wurde im Wildtyp durch die Anwesenheit eines anderen Immunsuppressivums nicht signifikant beeinflusst. In den MDCKII-MDR1 Zellen war das Transportverhältnis der Substanzen in Kombination dagegen deutlich niedriger im Vergleich zur jeweiligen Substanz allein. Die K_m für den Transport in MDCKII-WT-Zellen betrug 12 μ M und für MDCKII-MDR1-Zellen 27 μ M, die V_{max} 11110 pmol/cm²/h (WT) und 16670 pmol/cm²/h (MDR1). Die P_{app} -Werte des Transports von Everolimus und Tacrolimus zeigten keinen Unterschied zwischen MDCKII-WT und MDCKII-MRP1 Zellen. Die Netto Fluxion von Ciclosporin (9.4 im WT zu $6.0 \cdot 10^{-6}$ cm/s) und Sirolimus (11.5 im WT zu $6.1 \cdot 10^{-6}$ cm/s) war niedriger. Die Transportrate war in MRP1-überexprimierenden Zellen ebenfalls niedriger: 2.5 (MRP1) zu 3.2 (WT) für Ciclosporin und 2.7 (MRP1) zu 3.9 (WT) für Sirolimus. Die Raten für Tacrolimus und Everolimus waren dagegen vergleichbar (3.2 zu 3.0 bzw. 3.2 zu 3.7). 5 μ M Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus oder Everolimus zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Permeabilität oder der Transportrate bei MDCKII-MRP2 und MDCKII-MRP3 Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Die beobachteten Unterschiede in der Expression hepatobiliärer Transporter bei PSC und PBC sind wahrscheinlich auf adaptive Mechanismen zurückzuführen. Die verminderte Expression von OATP-C könnte den Hepatozyten vor weiterer Aufnahme organischer Anionen (z.B. Gallensalze) schützen. Ebenso führt die höhere Expression von BSEP zu einem verstärkten Export von Gallensalzen aus dem Hepatozyten. Die veränderte Lokalisation von MRP2 stellt einen weiteren Mechanismus zur Regulation des Gallenflusses dar. In der Pathogenese der PBC oder PSC scheinen die untersuchten Transporter aber keine Rolle zu spielen. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen mRNA- und Protein-Ebene deuten auf weitere Regulationsmechanismen hin.

Ciclosporin, Everolimus und Sirolimus sind Substrate des MDR1. Es konnte gezeigt werden, dass der MDR1-Transport bei einer Kombination der Immunsuppressiva gehemmt wird. Daraus könnte eine Änderung der oralen Bioverfügbarkeit resultiert, was bei einer Kombinationstherapie mit beachtet werden sollte. Ciclosporin und Sirolimus scheinen zusätzlich Substrate des MRP1 zu sein. Für Sirolimus konnte gezeigt werden, daß es in vitro MRP2, MRP3 und MRP6 induziert. Ob diese Induktion direkt oder indirekt ist, bleibt jedoch unklar. Die aufgezeigten Interaktionen unterstützen die Vermutung, dass Immunsuppressiva durch Beeinträchtigung des hepatobiliären Transportes eine Cholestase hervorrufen können.

KEYWORDS / SCHLAGWÖRTER

Keywords:

ABC-Transporter

PBC / PSC

Everolimus

Schlagwörter:

ABC-Transporter

PBC / PSC

Everolimus

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Actin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cholsäure
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units (Kolonie-formende Einheiten)
C _T	Threshold Cycle (Schwellenwertzyklus)
CV	Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert x 100 [%])
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
E ₂ 17G	Estradiol-17β-D-Glucuronid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FAM	Carboxy-Fluorescein
FCS	Fötales Kälber Serum
FXR	Farnesoid X Rezeptor

g	Gramm bzw. Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
gDNA	Gesamt-DNA
gRNA	Gesamt-RNA
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K _d	Gleichgewichtskonstante
LBB	Luria-Broth-Boullion
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
MCS	multiple cloning site
β -ME	β -Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht
NaOH	Natriumhydroxyd
nt	Nukleotid
NTC	Non-Template Control
OD	optische Dichte
PBC	primäre biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PXR	Pregnane X Receptor
RAR	Retinoid Acid Receptor
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Carboxy-X-Rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
RXN	Reaktions-Mix
RXR	Retinoid X Rezeptor
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEER	Trans Epithelial Electric Resistance
UDCA	Ursodesoxycholsäure
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben
WT	Wildtyp
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid
z.A.	zur Analyse

1. EINLEITUNG

1.1 Bildung und Zusammensetzung der Galle

Eine der wichtigsten Funktionen der Leber ist die kontinuierliche Gallenbildung. Der Transport von endogenen und körperfremden Substanzen zwischen Blut und Galle wird durch verschiedene membranständige Import- und Export-Systeme in den Hepatozyten und Cholangiozyten vermittelt. Besonders gut untersucht ist der Transport von Gallensalzen im enterohepatischen Kreislauf, an dem sich verschiedene Transporter in Hepatozyten, Cholangiozyten und Enterozyten beteiligen. Substanzen können aus dem sinusoidalen Blut extrahiert und in die Leberzellen aufgenommen werden. Sie werden in den Hepatozyten metabolisiert und anschließend in die Galle transportiert. Die Galle wird nach ihrer Bildung in der Gallenblase gesammelt und auf einen Reiz, z.B. bei Nahrungsaufnahme, in das Duodenum ausgeschüttet. Im terminalen Ileum werden fast alle Gallensalze (95 %) wieder resorbiert und mit dem portalen Blut zurück in die Leber transportiert.

Die wichtigsten Bestandteile der Galle sind neben Wasser und anorganischen Ionen die Gallensalze (ca. 67 %), Phospholipide und andere körpereigene und körperfremde Substanzen, die meist als Glukuronide ausgeschieden werden, wie z.B. der Gallenfarbstoff Bilirubin; ausserdem enthält die Galle einen geringen Anteil Cholesterol.

Die Gallensäuren werden durch den klassischen (neutralen) Weg und den alternativen (sauren) Weg aus Cholesterol synthetisiert. 50 % des täglich eliminierten Cholesterols wird so zu den als primäre Gallensäuren bezeichneten Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) umgeformt. Die erst im Darm entstehenden Gallensäuren, z.B. Lithocholsäure (LCA) und Desoxycholsäure (DCA), werden als sekundäre Gallensäuren bezeichnet. Nach ihrer Synthese in den Hepatozyten werden die Gallensäuren mit Glycin oder Taurin durch eine Peptidbindung konjugiert. Dieses senkt den pKa-Wert der Gallensalze auf weniger als 3 und erhöht ihre Löslichkeit. Bei physiologischem pH liegen sie in der Gallenflüssigkeit und im Blut in negativ geladener Form vor, weshalb von Gallensalzen gesprochen wird.

Die Galle dient im Darm der Emulsion und Resorption von Fetten und fettlöslicher Substanzen, z.B. den Vitaminen A, D, E und K. Sie ist wichtig für die Homöostase des Cholesterols und der Exkretion fettlöslicher Xenobiotika, Medikamente und Schwermetallen. In die Galle wird auch IgA sezerniert, womit die Gallenbildung auch an der Immunabwehr beteiligt ist.

1.2 Die hepatobiliären Transporter

1.2.1 Hepatobiliäre Transporter

Hepatozyten sind, wie die meisten epithelialen Zellen, polarisiert und besitzen eine basolaterale (sinusoidale) und eine apikale (kanalikuläre) Membran. Beide Membranen sind reichlich mit Transportern ausgestattet (Abb.1).

Die Aufnahme verschiedener Substanzen aus dem Blut wird mit Hilfe von basolateral exprimierten Transportern, die die Aufnahme von Gallensalzen, organischen Anionen und Kationen durchführen, bewerkstelligt¹. Am wichtigsten für die Gallensäure-Aufnahme sind die sogenannten "Solute Carrier"-Transporter, zu denen u.a. der Natrium/Taurocholat Cotransporter (NTCP) und das Organic Anion Transporting Peptide Typ C (OATP-C) gehören. Im Hepatozyten werden exogene und endogene Substanzen meistens in anionische Konjugate mit Glutathion, Glucuronat, Sulfat oder anderen negativ geladenen Molekülen umgewandelt,

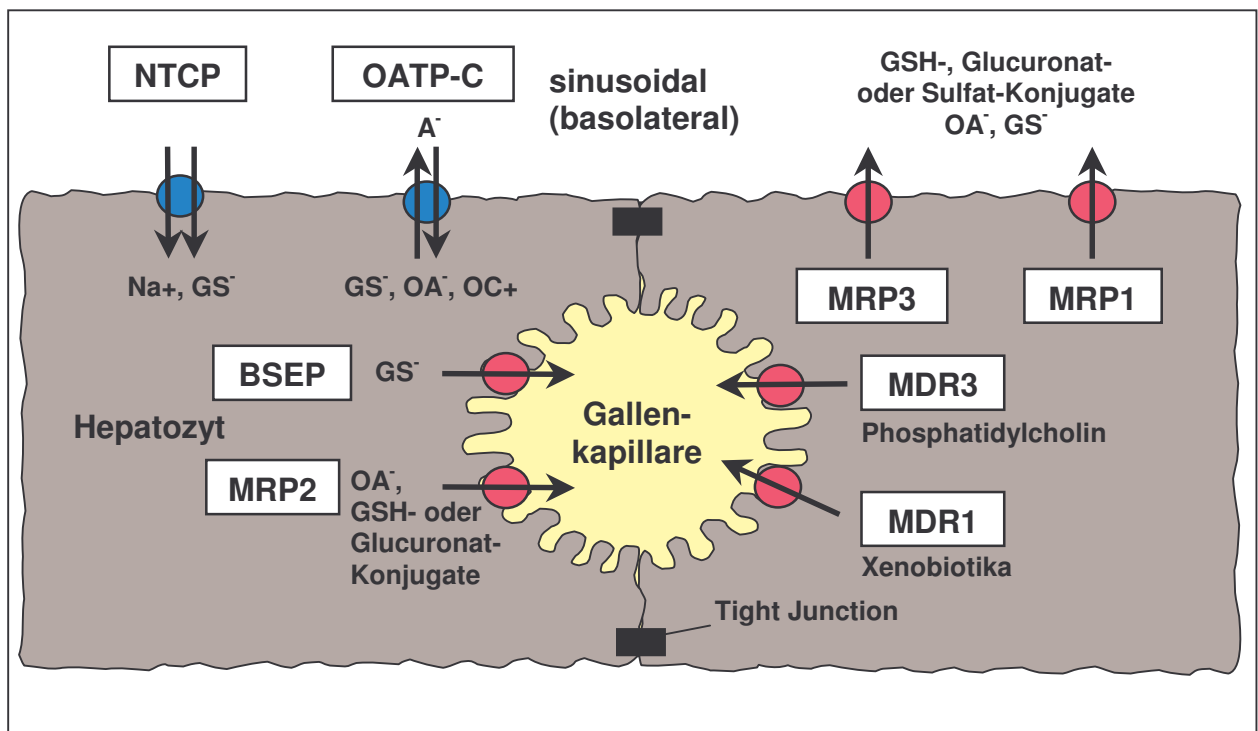


Abb.1: Lokalisation und Substrate der wichtigsten hepatobiliären Transporter im Hepatozyten. Der Transport von Gallensäuren wird hauptsächlich durch NTCP, OATP-C und BSEP vermittelt. Zusätzlich spielen MRP1, MRP2, MRP3, MDR1 und MDR3 eine wichtige Rolle in der Gallenbildung. GS, Gallensäuren; GHS, Glutathion; OA, organische Anionen; OC, organische Kationen.

weil hydrophile Substanzen besser in den extrazellulären Raum transportiert werden können. In der kanalikulären Domäne der Hepatozyten befinden sich Transporter, die diese Substanzen unter Verbrauch von ATP gegen einen Konzentrationsgradienten in die Galle transportieren. Die wichtigsten Transporter für Gallensäuren und anderer endogener und exogener Substanzen gehören zur Superfamilie der ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter, z.B. die Bile Salt Export Pump (BSEP), das P-Glycoprotein (MDR1) und das Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2). Zur besseren Unterscheidung werden bei humanen Transportern die Akronyme in Grossbuchstaben und bei Nagetieren klein (z.B. Mrp2) geschrieben.

1.2.2 ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter

Die ABC-Transporter-Superfamilie umfasst eine der grössten bekannten Proteinfamilien, mit Mitgliedern in fast jedem Organismus, vom Bakterium bis zum Säugetier. Die ABC-Transporter werden im Menschen in den meisten sezernierenden Epithelien, einschliesslich Leber und Darm, exprimiert. Die ABC-Transporter rückten in den letzten Jahren in das Licht des Interesses, als erkannt wurde, dass sie eine beträchtliche medizinische, industrielle und ökonomische Bedeutung haben.

So spielen Sie eine große Rolle bei Resistenzen gegen Antibiotika und Antimykotika, vermitteln dem Malaria-Erreger Plasmodium die Resistenz gegen Malariamedikamente und Pflanzen die Resistenz gegen Herbizide. Jährlich sterben zehntausende Menschen an Krebs, weil die Chemotherapie aufgrund der Überexpression von ABC-Transportern im Tumorgewebe fehlgeschlagen ist. Beim Menschen können Mutationen in den Genen, die für die ABC-Transporter kodieren, zu verschiedenen Stoffwechselkrankheiten führen.

Alle eukaryotischen ABC-Transportern sind Exporter. Einige sind sehr substratspezifisch, andere multispezifisch. Alle ABC-Transporter sind aktive Transporter, mit zur Zeit nur wenigen bekannten Ausnahmen: Der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) ist ein Chlorid-Ionen Kanal und der Sulphonylrezeptor (SUR1) dient als Regulator eines Ionenkanals.

Von den 8 Subfamilien der humanen ABC-Transporter sind für den Transport von gallegängigen Substanzen und Medikamenten die der ABCB- und ABCC-Familie besonders interessant. Für andere ABC-Transporter wurde ebenfalls ein Zusammenhang mit dem MDR-Phänotyp und dem Transport von Xenobiotika ermittelt, z.B. ABC2 (ABCA2) und BCRP (ABCG2). Auf diese soll aber nicht näher Eingegangen werden. In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht der in dieser Arbeit besprochenen ABC-Transporter.

1.2.2.1 Transporter der Pgp Subfamilie (ABCB, MDR/TAP)

Ein bedeutendes Problem in der klinischen Onkologie ist das Auftreten von Resistenzen des Tumorgewebes gegenüber der medikamentösen Behandlung. Dieses Phänomen wird als „Multidrug Resistance“ (MDR) bezeichnet. Eine Verbindung zwischen MDR Phänotyp und der Expression eines Effluxtransporters wurde von R. L. Juliano und V. Ling (1976) durch die Entdeckung des ABC-Transporters MDR1 bestätigt. Das 170 kDa große Glycoprotein wurde als P170 oder P-Glycoprotein bekannt und ist der erste im Menschen charakterisierte ABC-Transporter. Gleichzeitig wurde entdeckt, dass der Phänotyp MDR durch die Gabe von Inhibitoren, die die Funktion des MDR1 hemmen, umkehrbar war. MDR1 war damit als mögliches Ziel für die Verbesserung der Tumorthherapie erkannt worden.

MDR1 ist in der kanalikulären Membran von Hepatozyten lokalisiert und vermittelt die Sekretion großer lipophiler Moleküle (u. a. Zytostatika, Ciclosporin) in die Galle. Zusätzlich wird MDR1 in vielen anderen Epithelien exprimiert, u.a. in der Blut-Hirn-Schranke, in Enterozyten und proximalen Tubuluszellen der Niere.

MDR3 (ABCB4) ist leberspezifisch in den Hepatozyten apikal exprimiert und ein Phospholipid-Transporter, der Phosphatidylcholin in die Galle transportiert.

Der 170 kDa große, leberspezifisch in der kanalikulären Membran von Hepatozyten exprimierte Transporter Bile Salt Export Pump (BSEP, ABCB11) sezerniert Gallensalze in die Galle. Obwohl strukturell homolog zu MDR1 vermittelt er keine Resistenzen, mit der möglichen Ausnahme von Taxol (Paclitaxel). BSEP ist ein Ziel Cholestase-auslösender Medikamente, wie z.B. Östrogen, Troglitazon und Bosentan.

1.2.2.2 Transporter der MRP Subfamilie (ABCC, CFTR/MRP)

Die Familie der Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) besteht gegenwärtig aus 9 Mitgliedern (MRP1 bis MRP9). Die Fähigkeit einiger dieser Membranproteine eine große Anzahl an Zytostatika und anderen Medikamenten aus Zellen heraus zu transportieren, hat der Familie den Namen gegeben: MRP1 vermittelt Resistenz gegen Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Vincristin und Etoposid. Ausserdem findet ein schwacher Transport von Taxol, Vinblastin und Colchicin statt. Auch Schwermetall-Anionen, z.B. Arsenit, Arsenat, trivalente und pentavalente Antimone, werden durch MRP1 transportiert^{2,3}. Die bevorzugten Substrate für MRP1 sind organische Anionen, z.B. auch Pharmaka konjugiert an Glutathion (GSH),

Glucuronat, oder Sulfat. MRP1 wird in fast allen Geweben exprimiert, einschliesslich Lunge, Testis und in niedriger Rate in der Leber.

MRP2 wurde mit Hilfe der Rattenstämme Groningen Yellow TR/GY-Ratten (Wistar-mutaten)^{4,5} und Eisai hyperbilirubinämischen Ratten (EHBR)⁶ charakterisiert. Diese Ratten haben einen Defekt im Mrp2-Gen, mit ähnlichem Phänotyp wie bei Patienten mit Dubin-Johnson, die eine Mutation des humanen Homologs MRP2 tragen.

MRP1, MRP2 und MRP3 haben eine ähnliche Substratspezifität. MRP2 transportiert Vincristin, Cisplatin, Etoposid, CPT-11 und SN-38^{7,8} und MRP3 Doxorubicin, Methotrexat, Vincristin, Epirubicin, Mitoxantron und Etoposid⁹. Weitere Substrate von MRP1 und MRP2 sind Leukotriene C4, 2,4-Dinitrophenyl-S-Glutathion (DNP-SG) und Estradiol-17 β (β -D-Glucuronid) (E₂17G). Eine umfangreiche Liste der Substrate für MRP1, MRP2 und MRP3 findet sich in einem Review-Artikel von König et al.¹⁰.

Die Transporter der MRP-Subfamilie bestehen aus einem 180 bis 200 kDa großen Polypeptid mit zwei Nukleotid-bindenden-Domänen (NBD) und zwei transmembranösen Domänen (TMD). Im Gegensatz zu Transportern der Pgp-Subfamilie besitzen MRP1, MRP2, MRP3 und MRP6 eine zusätzliche N-terminale transmembranöse Domäne (TMD₀) mit 5 transmembranösen Helices, also insgesamt 17 Helices (6+6+5). Diese scheint aber zumindest bei MRP1 nicht für die Transporteraktivität nötig zu sein¹¹. MRP1, MRP2, MRP3 und MRP6 werden in der Leber exprimiert, wobei MRP1 ubiquitär exprimiert wird und nur schwach in der Leber. MRP2 wird, zusammen mit BSEP und MDR1, in der apikalen Domäne des Hepatozyten exprimiert. Zusätzlich wird MRP2 in den proximalen Tubuluszellen der Niere und in Jejunum und Duodenum exprimiert. MRP1, MRP3 und MRP6 sind basolateral (sinusoidal) in den Hepatozyten lokalisiert. MRP3 findet sich zusätzlich in Lunge und Darm, MRP6 in der Retina, Haut und Gefässen. Am stärksten ist MRP6 jedoch in Leber und Niere exprimiert. Die physiologische Funktion von MRP6 ist noch unklar.

Der Phänotyp MDR ist auch mit anderen Transportern anderer Protein-Familien in Verbindung gebracht worden, z.B. mit dem Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2), ABC2 (ABCA1) und dem nicht zu den ABC-Transporter zählenden Lung Resistance Protein (LRP).

ABC-Transporter (Exporter; ATP-abhängiger Transport)							
Name alias	Gen Symbol (HGNC)	AS	MW (kDa)	Chromosom	Accession Nr.	Expression (Domäne)	Substrat
Pgp Subfamilie (ABCB, MDR/TAP)							
MDR1 P-gp PGY1 GP170	ABCB1 28 Exons	1279	170	7q21.12	NM_000927	H, CH (A) Viele Epithelien, HBS	MDRP
MDR3 MDR2 PGY3 ABC21	ABCB4 28 Exons	1279	170	7q21.12	NM_000443	H (A)	PC
BSEP SPGP PGY4 ABC16	ABCB11	1321	170	2q24.3	NM_003742 XM002644 NP003733	H (A)	GS
MRP Subfamilie (ABCC, CFTR/MRP)							
MRP1 MRP MOAT	ABCC1 31 Exons	1531	180-195	16p13.12	NM_004996 NP_004987	H, CH (BL) Testis, Lunge	OA, MDRP
MRP2 cMOAT	ABCC2 32 Exons	1545	190-200	10q24.2	NM_000392	H (A) Darm, Niere	OA, MDRP
MRP3 MOAT-D cMOAT-2	ABCC3	1527	190-200	17q21.33	NM_003786	H, CH (BL) Lunge, Darm	OA*, MDRP
MRP6	ABCC6	1503	180	16p13.12	AF076622	H (BL) Niere	Peptide, Gluthathion

Tabelle 1: Eine kurze Übersicht über die in dieser Arbeit besprochenen ABC-Transporter; Abkürzungen: A, apikal; BHS, Blut-Hirn-Schranke; BL, basolateral; CH, Cholangiozyten; cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter; EN, Enterozyten; GS, Gallensalze; H, Hepatozyten; HGNC, HUGO Gene Nomenclature Committee; MDRP, Multidrug Resistance Phänotyp; MOAT, multispecific organic anion transporter; OA, organische Anionen; OK, organische Kationen; PC, Phosphatidylcholine. *einschliesslich Gallensalze

1.2.3 Transporter der SLC-Familie

Die SLC-Familie schliesst Gene ein, die für passive Transporter, Ionen-gekoppelte Transporter und Exchanger kodieren. Die Nomenklatur ist nicht einheitlich, so dass viele Namen für die SLC existieren. Das Human Genome Organisation Nomenklatur Komitee (HGNC) stellt eine Liste der Transporterfamilien der Solute Carrier (SLC) Gene zur Verfügung (siehe <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). In Tabelle 2 findet sich eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit besprochenen SLC-Transporter.

Mitglieder der OATP-, OCT/OAT- und NTCP-Familien sind wichtige Transporter für die Aufnahme von gelösten Stoffen in Hepatozyten und befinden sich an der sinusoidalen

Membran. Es kann große Unterschiede in der Substratspezifität zwischen Isoformen und Orthologen einer Familie geben. Alle Transporter dieser drei genannten Familien sind Importer.

1.2.3.1 SLC10 Familie der Natrium/Taurocholat Cotransporter (NTCP)¹²

Die SLC10 Familie enthält über 50 Mitglieder in tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Spezies. Im Menschen gibt es zwei gut charakterisierte Mitglieder und drei Orphan-Transporter, deren Funktion noch unbekannt ist.

Das 56 kDa große Na⁺/Taurocholate Cotransporting Peptide (NTCP, SLC10A1) ist der wichtigste Transporter für die Na⁺-abhängige Aufnahme von Gallensalzen in die Hepatozyten¹³. Zusammen mit dem apikalen Natrium-abhängigen Gallensalztransporter (ASBT, IBAT, SLC10A2), der in der apikalen Membran der Ileozyten exprimiert wird und die Resorption von konjugierten und unkonjugierten Gallensalzen aus dem Darmlumen durchführt, ist er ein wichtiger Bestandteil des enterohepatischen Kreislaufs.

1.2.3.2 SLCO / SLC21 - Organic Anion Transporting Peptide (OATP)-Familie¹⁴

Die Organic Anion Transporting Polypeptides bilden eine Superfamilie von Na⁺-unabhängigen Transportern, die den Transport von amphiphatischen organischen Substanzen, z.B. konjugierte Steroide, Gallensalze, Digoxin und anderen endogenen und exogenen Substanzen, vermitteln¹. Obwohl einige OATPs in der Leber die Aufnahme Albumin-gebundener Komponenten aus dem portalen Blut spezifisch regeln, sind viele OATPs in verschiedenen Geweben exprimiert, einschliesslich Blut-Hirn-Schranke, Lunge, Herz, Darm, Niere, Plazenta und Testis. Alle Oatps/OATPs sind innerhalb der OATP/SLCO Superfamilie neu klassifiziert und in Familien (> 40 % Identität in der Aminosäure-Sequenz) und Subfamilien (>60 % Identität der Aminosäure-Sequenz) unterteilt worden¹⁵. Der Mensch besitzt 11 Mitglieder aus der SLCO-Superfamilie, von denen vier im Hepatozyten exprimiert werden. OATP-C und OATP8 (OATP1B1/SLCO1B1 und OATP1B3/SLCO1B3 aus der OATP1B/SLCO1B1 Subfamilie) sind hauptsächlich für den Gallensalz-Transport in humanen Hepatozyten verantwortlich, mit zusätzlichen wichtigen Aufgaben, wie z.B. die Aufnahme von Östrogen, Thyroidhormonen, Bilirubin, Digoxin, Bromosulphthalein und zyklischer Peptide^{16,17}. Das 84 kDa große und 691 Aminosäuren lange Glykoprotein OATP-C wird nur in der basolateralen Membran der Hepatozyten exprimiert und ist der wichtigste Na⁺-unabhängige Aufnahme-Transporter für Bilirubin und Gallensalze. OATP-A (OATP1A2/SLCO1A2, OATP1A Subfamilie) transportiert

ein breites Spektrum an Xenobiotika. Neben diesen wird noch OATP-B (OATP2B1/SLCO2B1, OATP2B Subfamilie) in der Leber exprimiert, welches aber keine Gallensalze transportiert¹⁷.

Neben diesen beiden Familien sind Transporter aus der organische Kationen/ organische Anionen Familie (OCT/OAT-Familie, SLC22) ebenfalls wichtig für den Transport von Gallensalzen und Xenobiotika. Sie wurden in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht und werden deswegen hier auch nicht näher besprochen.

Solute Carrier Proteine (Importer)							
Name alias	Gen Symbol (HGNC)	AS	MW (kDa)	Chr.	Accession Nr.	Expression (Domäne)	Substrat
SLC10 Familie der Natrium/Taurocholat Cotransporter							
NTCP LBAT	SLC10A1	349	56	14q24.1	NM_003049	H (BL) Pankreas	GS Na ⁺ -abhängig
ASBT ISBT IBAT	SLC10A2	348	50	13q33	NM_000452	EN, CH (A) Ileum, Niere	GS Na ⁺ -abhängig
SLCO / SLC21 - Organic Anion Transporting Peptide (OATP)-Familie							
OATP-A OATP OATP1	SLCO1A2 (SLC21A3)	670	80	12p12	NM_005075 NP_005066 NM_021094	BHS Leber, Niere	OA*, Xenobiotika
OATP-C OATP2 LST-1	SLC01B1 (SLC21A6)	691	84	12p12	NM_006446 NP_006437	H (BL)	OA*
OATP8 LST-2	SLC01B3 (SLC21A8)	702	120	12p12	NM_019844 AJ251506	H (BL)	OA*, Digoxin
OATP-B OATP-RP2	SLCO2B1 (SLC21A9)	709	85	11q13	NM_007256 NP_009187	H (BL)	OA

Tabelle 2: Ein Überblick über die wichtigsten SLC-Transporter der Leber; Abkürzungen: A, apikal; ASBT, apical sodium bile salt transporter; BHS, Blut-Hirn-Schranke; BL, basolateral; CH, Cholangiozyten; EN, Enterozyten; GS, Gallensalze; H, Hepatozyten; HGNC, HUGO Gene Nomenclature Committee; IBAT, ileal bile acid transporter; LBAT, liver bile acid transporter; LST, liver specific transporter; OA, organische Anionen.

*einschliesslich Gallensalze

1.3 Störung des hepatobiliären Transportes

1.3.1 Definition der Cholestase

Die Bildung der Galle ist eine wichtige Aufgabe der Leber und auftretende Störungen, z.B. durch Medikamente, Infektionen, metabolische oder genetische Defekte, können zum klinischen Bild der Cholestase führen.

Die Cholestase ist definiert als eine Störung der Bildung, der Sekretion oder des Abflusses der Galle in den Darm, welche mit einer reduzierten biliären Sekretion organischer Anionen und anderer choleophiler Bestandteile assoziiert ist. Dies führt zu biochemischen, physiologischen, morphologischen und klinischen Veränderungen.

Die Ursachen hierfür können auf Erkrankungen bzw. Funktionsstörungen sämtlicher an der Bildung und am Transport der Galle beteiligten Strukturen beruhen, vom Hepatozyten (Organellen) über die verschiedenen sekretorisch und resorptiv tätigen Strukturen (Gallengänge) bis zur Einmündungsstelle in den Darm.

Verminderte oder abwesende Expression oder Funktion von hepatozellulären Transportern wurde in mehreren Erkrankungen und Tiermodellen gefunden. Diese Veränderungen können einige erworbene und ererbte Störungen des Gallenflusses erklären.

1.3.2 Hereditäre cholestatische Erkrankungen

Mittlerweile sind einige angeborene cholestatische Lebererkrankungen, bei denen Mutationen in hepatobiliären Transportern die molekulare Ursache darstellen, bekannt (Tab. 1). Zu diesen zählt die autosomal-rezessiv vererbte Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase (PFIC). Sie kann in drei Typen unterteilt werden: Typ I, auch als Byler's Disease bekannt, wurde zuerst in einer Amish-Familie beschrieben. Sie beginnt mit cholestatischen Episoden im Säuglingsalter, voranschreitend bis zur permanenten Cholestase und Tod in der Kindheit, begleitet von Ikterus und Pruritus. Das betroffene Gen kodiert für die P-Typ ATPase FIC1 (ATP8B1). Die Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis (BRIC) ist zwar für den gleichen Locus beschrieben worden, schreitet aber trotz wiederkehrender cholestatischer Attacken nicht zu einer chronischen Lebererkrankung voran. Die PFIC ist charakterisiert durch einen niedrigen (Typ I und II) bzw. hohen (Typ III) γ -Glutamyltransferase-Wert und hoher Gallensäure-Konzentration im Serum.

Bei Patienten, die unter PFIC Typ II leiden, schreitet die Krankheit ebenso schnell voran, so dass in der ersten Lebensdekade eine Lebertransplantation nötig wird. Die molekulare Ursache für PFIC Typ II ist eine Mutation in dem Gen für die kanalikuläre Exportpumpe BSEP.

PFIC Typ III unterscheidet sich von den beiden anderen Typen deutlich. Sie geht mit einer Proliferation der Gallengänge und entzündlichen Infiltraten in der Portalregion einher. Der molekulare Mechanismus ist ein Defekt des Transporters MDR3, der Phosphatidylcholin in die Galle transportiert. Ist ein weiblicher Patient heterozygot, kann sich während einer Schwangerschaft eine intrahepatische Cholestase der Schwangerschaft (intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, ICP) und später eine biliäre Zirrhose entwickeln.

Das Dubin-Johnson Syndrom wird verursacht durch eine Mutation im ABCC2 (MRP2). Die Patienten leiden unter Hyperbilirubinämie, seltener unter Cholestase. Dieses Syndrom ist charakterisiert durch verminderte biliäre Exkretion endogener Konjugate.

Transporter	Gen / alias	Krankheit	Referenz
FIC1	FIC1	PFIC-1 (ByD und ByS) BRIC	Carlton et al. ¹⁸
BSEP	ABCB11 <i>sPGP</i> <i>PGY4</i>	PFIC-2 (ByS)	Strautnieks et al. ¹⁹
MDR3	ABCB4 <i>PGY3</i> <i>MDR2</i>	PFIC-3 (homozygot) ICP (heterozygot) Cholelithiasis	Deleuze et al. ²⁰ de Vree et al. ²¹ Lucena et al. ²²
MRP2	ABCC2 <i>cMOAT</i>	Dubin-Johnson Syndrom	Paulusma et al. ²³ Wada et al. ²⁴

Tabelle 3: Cholestatische Erkrankungen, hervorgerufen durch Mutationen in Transportproteinen. BRIC, Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis; ByD, Byler's Disease (Mitglieder der Familie Byler und ihrer Verwandten mit PFIC); ByS, Byler's Syndrom (Patienten mit PFIC, die keine Verwandtschaft mit der Familie Byler aufweisen); PFIC, Progressive Familiar Intrahepatic Cholestasis

Alle bisher aufgezählten Transporter sind kanalikuläre Exportpumpen. Die pathogenetische Signifikanz der hepatischen sinusoidalen Aufnahmetransporter ist bisher unklar. Für NTCP z.B. konnten keine Mutationen, die mit einem defekten Gallensalz-Transport assoziiert sind, nachgewiesen werden. Die vier OATPs, die in der Leber exprimiert werden, sind hoch

polymorph. Einige dieser Polymorphismen führen zu einer veränderten Substratspezifität, jedoch ohne klinischen Phänotyp.

Bekannt ist die primäre Gallensäure-Malabsorption (PBAM), verursacht durch eine Mutation im ASBT. Bei dieser Erkrankung ist der enterohepatische Kreislauf unterbrochen und eine schlechte Fettresorption durch den hohen Verlust an Gallensalzen die Folge.

1.3.3 Erworbene Störungen des Gallensäuren-Transportes

Erworbene cholestatische Erkrankungen sind wesentlich häufiger als angeborene Syndrome und umfassen vor allem die primär-biliäre Zirrhose (PBC), sepsisassoziierte Cholestase, medikamenteninduzierte Cholestase und Schwangerschaftscholestase. Die wesentlichen Erkenntnisse über Expression und Funktion der hepatischen organischen Anionentransporter wurden bisher in verschiedenen Tiermodellen der Cholestase gewonnen. Generell kommt es bei allen Cholestasemodellen zu einer transkriptionell regulierten Abnahme der Expression der basolateral gelegenen Transporter Ntcp und Oatp1. Die Proteinexpression von Oatp2 und Oatp4 ist dagegen in vielen Cholestasemodellen (obstruktive Cholestase, Ethinylestradiol) weitgehend unverändert. In allen Modellen der Cholestase kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Expression der kanalikulären Konjugat-Exportpumpe Mrp2 und bei einigen zu einer kompensatorisch erhöhten Expression des basolateral gelegenen Mrp3. Bsep bleibt meist unverändert.

1.3.4 Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronische, cholestatische Lebererkrankung. Sie ist definiert durch Entzündung, Fibrose und Destruktion der intra- und extrahepatischen Gallenwege. Langfristig entsteht bei Patienten mit PSC eine Leberzirrhose. Die PSC ist eine der häufigsten cholestatischen Erkrankungen (1-6 Fälle pro 100.000 Einwohner) und wird mit wachsender Frequenz diagnostiziert. Die Symptome der Krankheit sind nicht spezifisch und schließen Ikterus, Pruritus und Erschöpfung ein.

Die PSC wird in vier Stadien eingeteilt:

Stadium I: Entzündung, Bindegewebevermehrung um die kleinen Gallengänge

Stadium II: Entzündung greift auf Lebergewebe über, weitere Vernarbung

Stadium III: Stärkere Narbenbildung

Stadium IV: Biliäre Leberzirrhose

70-90 % der Patienten leiden zusätzlich unter einer entzündlichen Darmerkrankung. Patienten mit PSC haben eine erhöhte Inzidenz für Gallengangs-Karzinome, und jene mit ulzerativer Colitis haben zusätzlich eine erhöhte Inzidenz für Kolonkarzinome. Im Endstadium der Krankheit (Zirrhose) stellt die Lebertransplantation eine Therapieoption dar.

Die Ätiologie der PSC ist unbekannt. Bisher ist unklar, ob sie zu den angeborenen oder erworbenen Störungen der Gallebildung gehört. Immunologische Mechanismen könnten bei der PSC eine Rolle spielen, da eine Assoziation mit ulzerativer Colitis und Autoantikörpern besteht, jedoch bringt eine immunsuppressive Therapie keinen Erfolg. Auch genetische Faktoren, sowie der Einfluss toxischer Substanzen und Infektionen sind diskutiert worden. Eine mögliche Beteiligung von hepatobiliären Transportern bei der Ätiologie der PSC wäre denkbar. Ähnliche Läsionen der Gallengänge bei Patienten mit Cystischer Fibrose legten z.B. den Verdacht für eine Beteiligung von CFTR-Polymorphismen bei Patienten mit PSC nahe. Während in einer Studie keine Unterschiede gefunden wurden²⁵, konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass 89 % (zu 57 % in der Kontrollgruppe) der 19 untersuchten PSC-Patienten eine Variante (1540G) trugen und eine erhöhte Anzahl von Mutationen bzw. Varianten (37 % bei PSC Patienten zu 9 % in der Kontrollgruppe) aufwiesen²⁶.

In einem der PSC ähnlichen Rattenmodell konnte eine chronische Cholangitis mit verminderter Mrp2-Expression gezeigt werden²⁷. Für Patienten mit PSC liegt bisher nur eine kleine Pilotstudie mit vier PSC-Patienten vor. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von OATP-C hoch- und von MRP2 runterreguliert wurde²⁸. Daten bezüglich der Expression anderer hepatobiliärer Transporter bei Patienten mit PSC liegen bisher nicht vor.

1.4 Immunsuppressive Therapie

Immunsuppressiva werden in der Transplantationsmedizin und zur Behandlung von Immunerkrankungen eingesetzt. Inzwischen sind mehrere Immunsuppressiva mit teils gleichen und teils unterschiedlichen Wirkmechanismen und Nebenwirkungsspektren verfügbar. Auf Ciclosporin (CsA), Tacrolimus (TRL), Sirolimus (SRL) und Everolimus (RAD) soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.4.1.1 Ciclosporin und Tacrolimus

Ciclosporin (CsA; Sandimmun[®], Neoral[®], Ciclohexal[®]) ist ein hydrophobes zyklisches Polypeptid aus 11 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 1202.63 Dalton (Abb. 2). Es wurde aus dem zu den Fungi Imperfecti zählendem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert. Tacrolimus (TRL, FK506; Prograf[®]) ist ein hydrophobes makrozyklisches Lakton mit einem Molekulargewicht von 804.0 Dalton, das 1985 aus *Streptomyces tsukubaensis*^{29,30} isoliert wurde (Abb. 2).

CsA und TRL haben den gleichen Wirkmechanismus und binden an Immunophiline innerhalb der Zielzelle, nämlich Cyclophiline bzw. FK-bindende Proteine (FKBP). Immunophiline sind Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen. Der Komplex aus Immunophilin und Medikament bindet an die sonst auf ein Signal vom T-Zell Rezeptor durch Ca^{2+} aktivierte Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin und hemmt dadurch die Dephosphorylierung des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NF-AT), dessen dephosphorylierte Form in den Zellkern wandert und dort die Transkription von frühen T-Zell Aktivierungsgenen (z.B. IL-2, c-myc, IL-3, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$) steuert^{31,32}. Die Hauptnebenwirkungen dieser Immunsuppressiva stellen die Nephrotoxizität, Neurotoxizität, Hypercholesterin- und Hypertriglyzeridämie dar.

1.4.1.2 Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus (RAD)

Sirolimus (SRL, Rapamycin; Rapamune[®]) ist eine aus dem Actinomyceten *Streptomyces hygroscopicus* gewonnene makrozyklische Substanz mit einem Molekulargewicht von 914.2 Dalton³³. Sirolimus und Tacrolimus sind miteinander verwandte Substanzen, die aus unterschiedlichen Streptomyces-Arten isoliert wurden, jedoch einen unterschiedlichen Wirkmechanismus haben.

Everolimus (RAD, SDZ-RAD; Certican[®]) ist ein Derivat von Sirolimus und hat ein Molekulargewicht von 957.2 Dalton. Um die orale Bioverfügbarkeit von Sirolimus verbessern zu können, wurde eine 40-O-(2-Hydroxyethyl)-Seitengruppe angefügt (Abb. 2).

SRL und RAD haben einen anderen Wirkmechanismus als CsA und TRL. SRL und RAD inhibieren eine Reihe von Cytokin-vermittelten Signal-Transduktionswegen durch Komplexbildung mit dem Protein mTOR (mammalian Target of Rapamycin), einer 282 kDa grossen Phosphatidylinositol 3-Kinase. Somit bleibt die nachfolgende Aktivierung und anschliessende Proteinsynthese der S6 Kinase (p70^{SK6}) aus, und die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 unterbleibt. Die Hemmung von mTOR verhindert die Aktivierung der p34^{cdc2} Kinase und somit die Komplexbildung mit Cyclin E. Dieses hat zur Folge, dass das Voranschreiten der T-Zellen von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzykluses verhindert wird.

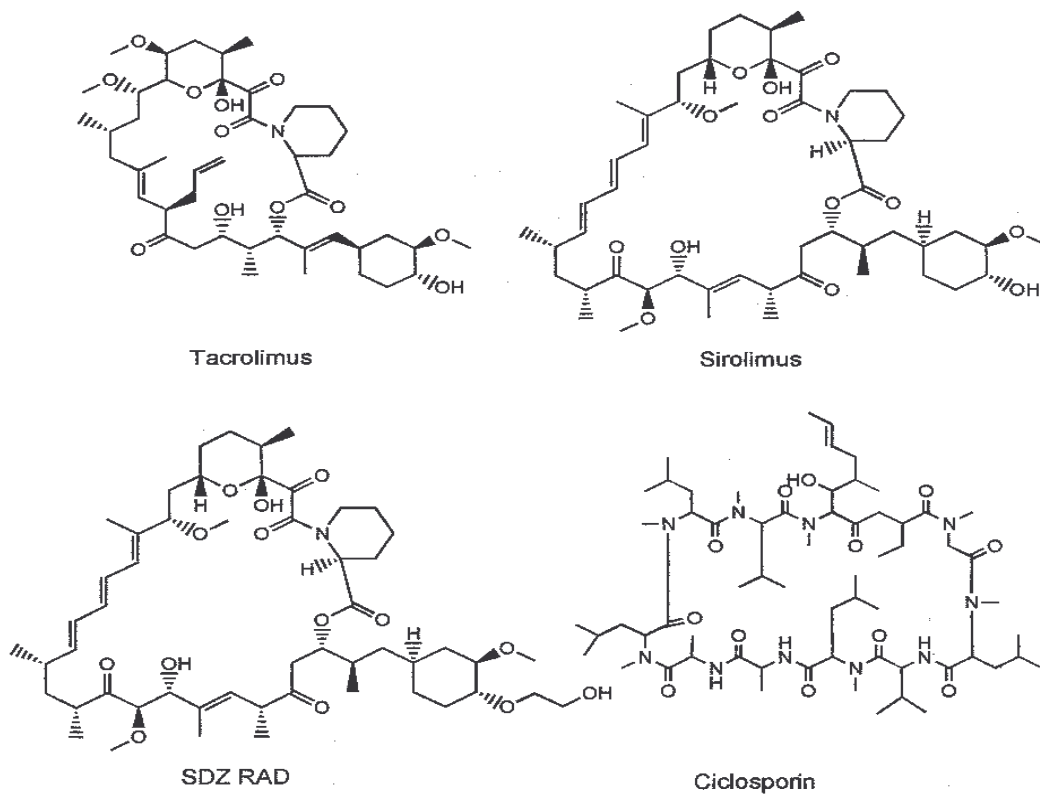


Abb. 2: Die Struktur von Tacrolimus, Sirolimus, Ciclosporin und Everolimus (SDZ RAD)

Alle vier Immunsuppressiva haben eine niedrige (10-30 %) und variable orale Bioverfügbarkeit (5-80 %) und ein sehr kleines therapeutisches Fenster. Dieses macht eine regelmäßige Blutspiegelbestimmung (therapeutisches Drug Monitoring) notwendig.

Die Immunsuppressiva werden im oberen Dünndarm resorbiert und im Darm oder in der Leber über das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) metabolisiert. 98 % der Immunsuppressiva werden über die Galle fäkal und nur 2 % mit dem Urin eliminiert. Dieses hat zur Folge, dass nicht nur eine Interaktion mit zahlreichen anderen Medikamenten, die ebenfalls über das CYP3A4 metabolisiert werden, sondern auch eine Interaktion der Immunsuppressiva untereinander beobachtet werden kann. Aber auch die kompetitive Hemmung des MDR1 spielt eine Rolle. CsA, TRL, SRL und RAD sind sowohl Substrate als auch Inhibitoren von MDR1.

Da CsA und TRL den gleichen Wirkmechanismus und somit auch die gleichen Nebenwirkungen haben, ist eine Kombinationstherapie dieser Immunsuppressiva nicht sinnvoll. SRL und RAD haben einen anderen Wirkmechanismus und ein anderes Nebenwirkungsspektrum als CsA und TRL, weshalb eine Kombinationstherapie von z.B. CsA und RAD, TRL und SRL deutliche Vorteile hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunsuppressiva bei einer Kombinationstherapie eine synergistische Wirkung haben und somit eine Dosisreduktion beider Substanzen möglich ist, was die Nebenwirkungen mildert.

Vorstellbar wäre, daß eine Interaktion der Immunsuppressiva am CYP3A4 und an den hepatobiliären Transportern ursächlich dafür wäre. Für z.B. Ketoconazol, einem CYP3A4-Inhibitor und einem MDR1-Substrat, konnte gezeigt werden, dass es die Bioverfügbarkeit von TRL³⁴ und SRL³⁵ erhöht.

1.4.2 Cholestase durch Immunsuppression

Die Immunsuppressiva Ciclosporin (CsA) und Tacrolimus (TRL) können eine Cholestase induzieren. Aus Tiermodellen ist bekannt, dass CsA sowohl die basolateral gelegenen hepatobiliären Transporter Oatp und Ntcp als auch die kanalikulär gelegenen Transporter Mrp2 und Bsep hemmt. Die kanalikulären Transporter werden von CsA stärker gehemmt als die basolateralen³⁶. Eine leichte cholestatische Veränderung, die durch zweiwöchige Fütterung von Ratten mit CsA bzw. SRL verursacht wurde, konnte in Beziehung mit einer niedrigeren mRNA-Expression von Mrp2 gesetzt werden. Eine Fütterung mit SRL erniedrigte die Mrp2 mRNA und erhöhte die mRNA-Menge von Oatp2. In Kombination kam es zu einer deutlich stärkeren Reduktion bzw. Erhöhung von Mrp2 bzw. Oatp2 mRNA. Für Bsep, Mdr1b, Mdr2, Ntcp und Oatp1 konnte kein Unterschied dargestellt werden³⁷. Für das neue Immunsuppressivum Everolimus (RAD) konnte nur gezeigt werden, dass es sowohl ein Substrat als auch ein Inhibitor von MDR1 ist³⁸.

1.5 Zusammenfassung der Fragestellung

In den letzten Jahren wurden mehrere hepatobiliäre Transporter entdeckt und deren Funktionen bestimmt. Über das Expressionsmuster der hepatobiliären Transporter bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), einer cholestatischen Lebererkrankung, ist bisher kaum etwas bekannt. Ob die hepatobiliären Transporter bei der Pathogenese der PSC eine Rolle spielen, oder ob es sich um ein sekundäres Phänomen handelt ist bisher unklar und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluß der Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus auf die hepatobiliären Transporter untersucht werden. Für Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus ist bekannt, dass sie eine Cholestase induzieren können. Die Ursache hierfür könnte eine Beeinträchtigung der hepatobiliären Transporter sein. Der Transport von Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus allein und vor allem in Kombination sollte im Transwell-Modell charakterisiert werden.

- Vergleich des Expressionsmusters verschiedener hepatobiliärer Transporter in der Leber bei Patienten mit fortgeschrittener Primär sklerosierender Cholangitis (PSC) versus gesunder Leber
 - Quantifizierung der mRNA-Expression mittels der Real-Time-PCR
 - Proteinbestimmungen mittels semi-quantitativem Westernblot und Immunhistologien
 - Untersuchungen zur Korrelation der Expression der hepatobiliären Transporter mit bestimmten Cholestaseparametern
- Untersuchungen zum Transport der Immunsuppressiva Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus (allein und in Kombination) in MDR1-, MRP1-, MRP2- und MRP3-überexprimierenden Zellen
 - Etablierung des Transwell-Transport-Modells für Immunsuppressiva
 - Quantifizierung der Immunsuppressiva mittels einer LC/Elektrospray-Massenspektrometrischen Methode
 - Berechnung der Permeabilität P_{app}
 - Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

A garose, ultraPURE [®] , Elektrophoresegrad	(Gibco BRL, Eggenstein)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Sigma, St. Louis, USA)
Albumin, Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	(Boehringer, Mannheim)
B acto-Agar, Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton	(Difco, Detroit, USA)
Blockingreagenz	(Amersham, Little Chalfont, UK)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	(Biomol, Hamburg)
Bromphenolblau, z.A.	(Serva, Heidelberg)
C oomassie Brilliantblau	(Gibco BRL, Eggenstein)
Ciclosporin	(Alexis, Grünberg)
4',6- D iamidino-2-phenylindole (DAPI)	(Molecular Probes, USA)
Diethyl-pyroc carbonat (DEPC)	(Appli Chem, Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck, Darmstadt)
Desoxyribonukleotide Mix (dNTPs)	(Sigma, St. Louis, USA)
Dodecylsulfat, Na-Salz, (SDS), z.A.	(Serva, Heidelberg)
E ssigsäure (Eisessig), z.A.	(Baker, Deventer, Niederlande)
Ethanol, 96 %, z.A.	(Baker, Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	(Sigma, St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Roth, Karlsruhe)
Everolimus (RAD)	(Novartis, Basel)
F ormaldehyd, 37 % Lösung,	(Sigma, St. Louis, USA)
G lycerin, 87 %, z.A.	(Merck, Darmstadt)
I mmu-Mount	(Thermo Shandon, Pittsburgh)
Isopropanol, z.A.	(Baker, Deventer, Niederlande)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	(Biomol, Hamburg)
K aliumacetat	(Fluka, Buchs, Schweiz)

L auroylsarcosin	(Sigma, St. Louis, USA)
M aleinsäure	(Sigma, St. Louis, USA)
β -Mercaptoethanol (β -ME)	(Sigma, St. Louis, USA)
Magermilchpulver, Glücksklee	(Nestlé, Frankfurt)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, z.A.	(Merck, Darmstadt)
Methanol	(Baker, Deventer, Niederlande)
MK-571	(Alexis, Grünberg)
3-Morpholin-Propansulfonsäure (MOPS)	(Fluka, Buchs, Schweiz)
N atriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat, wasserfrei, z.A.	(Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	(Merck, Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
O ligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	(Amersham, Little Chalfont)
Ponceau-S	(Sigma, St. Louis, USA)
2-Propanol, z.A.	(Baker, Deventer, Niederlande)
P roteinase K	(Sigma, St. Louis, USA)
Protease Inhibitor Cocktail Complete	(Roche, Mannheim)
R andom Primer	(Invitrogen, San Diego, USA)
RNaseOUT™	(Invitrogen, San Diego, USA)
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	(Promega, Madison, USA)
Rotiphorese® Gel 30	(Roth, Karlsruhe)
S irolimus (Rapamycin)	(Alexis, Grünberg)
T acrolimus (FK506)	(Fujisawa, Osaka, Japan)
Tetracyclin	(Sigma, St. Louis, USA)
N, N, N', N',-Tetramethyldiamin (TEMED), z.A.	(Merck, Darmstadt)
Tissue-Tec O.C.T.™ Compound	(Sakura, Zoeterwoude, NL)
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, z.A.	(Serva, Heidelberg)
Triton® X-100	(Merck, Darmstadt)
Trypsin EDTA-Lsg.	(Sigma, St. Louis, USA)
Tween® 20	(AppliChem, Darmstadt)

2.1.2 Kits

DNA 500 LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

ECL Western blotting detection reagents and analysis system (Amersham, Little Chalfont, UK)

Jetsorb-Gel Extraction Kit/300 (Genomed, Bad Oeynhausen)

Nucleobond[®] Kit AX 100 / PC 100 (Macherey-Nagel, Düren)

QIAGEN (Qiagen, Hilden)

- Genomic-tip
- Plasmid-Midi-Kit
- QIAquick PCR Purification Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- QIAshredder Säulchen zur Homogenisation
- RNeasy Mini Kit

qPCR[™] Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgien)

RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, San Diego, USA)

2.1.3 Marker

Nukleinsäure Marker

1 kb DNA-Ladder (Gibco BRL, Eggenstein)

100 bp DNA-Ladder (Gibco BRL, Eggenstein)

DNA 500 Ladder (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

RNA Ladder (0.24-9.5 Kb) (Gibco BRL, Eggenstein)

RNA 6000 Ladder (Ambion, Austin, USA)

Protein Marker für SDS-PAGE

Prestained Molecular Weight Marker	(Biorad, Hercules, USA)
Prestained Molecular Weight Marker, Low Range	(Biorad, Hercules, USA)
Benchmark™ Protein Ladder	(Invitrogen, San Diego, USA)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Blue Juice Gel Loading Buffer	<u>10x</u> : 65 % (w/v) Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.3 % (w/v) Bromphenolblau
DAPI Stock Lsg.	1 mg/ml in H ₂ O Aliquotiert und gelagert bei –20°C. Die Stocklösung ist bei 4°C für mindestens 4 Wochen stabil. Es wurden 2 µl der Stocklsg. in 1 ml PBS verdünnt eingesetzt
Gel Running Buffer	0.2 g Xylencyanol FF, 50 ml Glycerin, 0.5 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, ad 100 ml mit H ₂ O
SDS-Stocklösung	10 % (w/v) in autoklaviertem H ₂ O
50 x TAE	2 M Tris-Acetat, pH 8.1; 50 mM EDTA
10 x TBE	1 M Tris-HCl; 1 M Borsäure; 0.25 M EDTA, pH 8.3
1 x TE	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 – 8.0; 0.1 mM EDTA

2.1.5 Bakterienstämme und Zelllinien**2.1.5.1 Bakterienstämme**Genotyp E. coli TOP10 F' (abgeleitet von E. coli K12)

F'{*lacI*^q *Tn10*(TetR)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR*
recA1 *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

2.1.5.2 ZelllinienHepG2-Zellen

Bei den HepG2-Zellen (DMSZ No. 180, Braunschweig) handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus einem humanen hepatozellulären Karzinom (HCC) eines 15 Jahre alten männlichen Kaukasier entwickelt worden ist³⁹. Sie haben eine epitheliale Morphologie und besitzen 55 Chromosomen. HepG2-Zellen exprimieren OATP, aber nicht NTCP⁴⁰.

Caco-2-Zellen

J. Fogh isolierte diese Zelllinie aus einem primären Kolonkarzinom eines 72 Jahre alten männlichen Kaukasiers^{41,42}. Für Caco-2 Zellen konnte gezeigt werden, dass sie hinsichtlich des Absorptionsverhaltens ähnliche Qualitäten wie der Dünndarm aufweisen. Diese Zellen exprimieren neben anderen Transportern MDR1. Diese intestinalen Eigenschaften und die Expression von Transportern machen sie zum idealen Modell für In-Vitro Analysen der intestinalen Absorption von Medikamenten und anderen Xenobiotika^{43,44}. Einige der Medikamente metabolisierenden Enzyme, z.B. CYP3A4, fehlen unter normalen Kulturbedingungen, können aber durch $1\alpha,25$ -dihydroxy Vitamin D₃ (Calcitriol) induziert werden⁴⁵. Da die Expression von MDR1 in Caco-2 Zellen mit dem Alter variiert, ist es am günstigsten, Transportstudien mit MDR1-Substraten zwischen dem 17 und 27 Tag nach Aussaat zu machen⁴⁶. MRP1 und MRP5 sind schwach, MRP2 stark und MRP3 mit dauer der Kultur steigend exprimiert⁴⁷.

MDCKII-Zellen

Die MDCK Typ II-Zellen sind ein Derivat der MDCK-Zelllinie, isoliert von D. Louvard (1980). MDCK-Zellen wurden aus der Niere eines normal erscheinenden erwachsenen weiblichen Cocker Spaniel (*Canis Familiaris*) von S. H. Madin und N. B. Darby (1958) abgeleitet⁴⁸. Diese besitzen unterschiedliche TEER-Werte: ca. $4000 \Omega\text{cm}^2$ für Typ I und ca. $200\text{-}300 \Omega\text{cm}^2$ für Typ II⁴⁹. MDCK-Zellen wachsen in Zellkultur polar mit einer apikalen und einer basolateralen Domäne und eignen sich daher für Transportstudien.

Folgende transfizierte Zelllinien wurden uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. P. Borst des Instituts für Molekulare Biologie des Netherlands Cancer Institutes (NKI) in Amsterdam, Niederlande, mit freundlicher Unterstützung von Dr. T. de Knecht zur Verfügung gestellt. Da keine Angaben zu der Passagen-Nummer gemacht wurden, wurden die erhaltenen als Passage 1 bezeichnet. Alle Versuche wurden mit Zellen zwischen Passage 2 und 10 gemacht.:

	Klon	Plasmid	Insert	Accession No.
MDCKII MDR1	1.23	pCMV/neo	human MDR1 cDNA	M 14758
MDCKII MRP1	108	pCMV/neo	human MRP1 cDNA	X 78338
MDCKII MRP2	217	pCMV/neo	human MRP2 cDNA	U 49248
MDCKII MDR1	318	pCMV/neo	human MRP3 cDNA	AF 009670

2.1.5.3 Zellkultur-Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, Eggenstein)
with GlutaMAXTMI, 4500 mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat (Cat. No. 31966-021)

RPMI 1640 Medium (Gibco BRL, Eggenstein)
mit L-Glutamin (Cat. No. 21875-034)

Zusätze:

Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x) (Gibco BRL, Eggenstein)
10.000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin in 0.9 % NaCl
Penicillin-Streptomycin/Glutamin-Lösung (100x) (Gibco BRL, Eggenstein)
10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin und 29.2 mg/ml L-Glutamin; in 0.85 % NaCl
und 10 mM Citratpuffer

Für Caco2 und MDCKII Zellen wurde DMEM, versetzt mit Penicillin-Streptomycin-Lösung und 10 % FCS verwendet. Für HepG2-Zellen wurde RPMI 1640 Medium versetzt mit Penicillin-Streptomycin/Glutamin-Lösung und 10 % FCS verwendet.

Für Transportstudien im Transwell wurde Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), ohne Phenolrot, versetzt mit 5 mM Glucose und 12.5 mM HEPES, verwendet.

2.1.6 Primer für die PCR

MDR1 (AF016535)

Sense: 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'

Reverse: 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'

Template: 157 bp

Dieses Primerpaar funktioniert sowohl für die humane, als auch die canine (*Canis familiaris*) Version des MDR1. Nur ein Sequenzunterschied zum caninen Homolog findet sich im Reverse-Primer (GTTCAAACCTTCTGCTCCCGA).

2.1.7 Sonden und Primer für die Real-Time PCR

Die verwendeten Sonden waren am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (6-FAM) als Reporter und am 3'-Ende mit Tetramethylrhodamine (TAMRA) als Quencher konjugiert und wurden bei Eurogentec (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben. Das Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum für 6-FAM liegt bei 494 nm bzw. 525 nm, die Maxima von TAMRA liegen bei 565 nm bzw. 580 nm. TAMRA ist kein Dark Quencher und trägt daher zur Hintergrundfluoreszenz bei.

Die Primer wurden in einem Maßstab von 0.2 µmol bei MWG-Biotech synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in Ampuwa® (Fresenius, Bad Homburg) mit einer Stockkonzentration von 100 µM aufgenommen.

Die Sonden-Primer Kombinationen für MRP1, MRP2, MRP3 und MRP6 wurden von Taipalensuu et al.⁵⁰ übernommen, die restlichen (β-Actin, BSEP, NTCP und OATP-C) mit Primer3 erstellt.

	t _m Berechnung durch MWG	t _m Berechnung mit Primer3
Beta-Actin (X00351)		
Sense: 5'-TTCAACACCCCAGCCATGTA-3'	57.3	62.29
Reverse: 5'-AGTCCATCACGATGCCAGTG-3'	59.4	62.15
Sonde: 5'-CTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACG-3'		67.86
Template: 85 bp		
BSEP (NM_003742)		
Sense: 5'-GCTCCACACTTGTCTTGGAT-3'	59.4	60.12
Reverse: 5'-CCAAACAAGGAGAGGCATTG-3'	57.3	60.63
Sonde: 5'-CTCAGTGTCTAGTAGGAGCTTTAAATCTTGG-3'		65.34
Template: 111 bp		
NTCP (XM_004766)		
Sense: 5'-ATGTCATCAAGGGAGGGATGAT-3'	58.4	61.83
Reverse: 5'-GTCATGGCAAACATGATGCTCT-3'	58.4	62.36
Sonde: 5'-TCACAGTTCTCTCTGCCATCAATGTGGG-3'		71.94
Template: 100 bp		

OATP-C (XM_006617)

Sense: 5'-GCCGGACTAACCATGACCTA-3' 59.4 59.96

Reverse: 5'-TCCACAGACTGGTTCCCATT-3' 57.3

Sonde: 5'-TAGAGATGTACCACTTTCTTATTGCAACTCAGA-3' 66.01

Template: 118 bp

MRP1 (NM_004996)

Sense: 5'-GAAGGCCATCGGACTCTTCA-3' 59.4 62.63

Reverse: 5'-CAGCGCGGACACATGGT-3' 57.6 63.07

Sonde: 5'-CTCCTTCCTCAGCATCTTCCTTTTCATGTG-3' 71.02

Template: 70 bp

MRP2 (X96395)

Sense: 5'-TGCAGCCTCCATAACCATGAG-3' 59.8 63.39

Reverse: 5'-GATGCCTGCCATTGGACCTA-3' 59.4 63.25

Sonde: 5'-AGAGAGAACAGCTTTCGTCGAACACTTAGCC-3' 70.74

Template: 80 bp

MRP3 (XM_015525)

Sense: 5'-CACACGGATCTGACAGACAATGA-3' 60.6 63.41

Reverse: 5'-ACAGGGCACTCAGCTGTCTCA-3' 61.8 63.55

Sonde: 5'-CCAGTCACCTATGTGGTCCAGAAGCAGTTT-3' 71.32

Template: 76 bp

MRP6 (AF076622)

Sense: 5'-AGACACGGTTGACGTGGACAT-3' 59.8 62.8

Reverse: 5'-GCTGACCTCCAGGAGTCCAA-3' 61.4 62.74

Sonde: 5'-CCAGACAAACTCCGGTCCCTGCTGAT-3' 72.86

Template: 76 bp

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Präparation

Für die Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) und die Real-Time Detection-PCR (RTD-PCR) wurde Gesamt-RNA (gRNA) aus Lebergewebe bzw. aus der Zellkultur nach einer modifizierten single step Methode nach Chomczynski und Sacchi⁵¹ mit dem RNeasy[®] Kit (QIAGEN, Hilden) gewonnen.

Bei dieser Methode erfolgt die Zelllyse in einem Puffer mit Guanidinisothiocynat (GITC) und β -Mercaptoethanol (β -ME), der gleichzeitig Proteine (u.a. RNasen) sehr effektiv denaturiert. Das Lysat wird auf ein Säulensystem gegeben, deren Silica-Gel basierte Membran unter Einfluß von chaotropen Salzen (z.B. GITC) eine hohe Bindungsaffinität zu RNA hat. Nach Waschschritten zum Entfernen von Verunreinigungen wird die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Lebergewebe wurde nach der Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in kleinen RG bei -80°C verwahrt.

Es wurde versucht möglichst schnell und RNase-frei (GLP, Materialien, Chemikalien) zu arbeiten. Mörser, Stößel, Pinzetten und Löffel wurden für 8 h bei 200°C gebacken. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) durchgeführt.

Pro 20 mg Lebergewebe (ca. 80 μg RNA) wurde eine Säule (maximale Bindekapazität: 100 μg RNA) verwendet, für jede Isolation wurden vier Säulen verwendet. Dazu wurde Lebergewebe in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser in kleine Stücke zerschlagen. Die Stücke wurden in einem 1.5 ml RG abgewogen (ca. 80 mg) und dann in flüssigem Stickstoff im Mörser vollständig zermahlen. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 2.4 ml Lysis Puffer, mit 10 μl β -ME/ml frisch versetzt, vorgelegt. Das zermahlene Lebergewebe wurde in Flüssigstickstoff mit einem Löffel in den Lysis Puffer überführt. Nach dem Auftauen wurde diese Lösung zur Homogenisierung auf Qiashredder Säulen gegeben.

Für die Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurde der mit β -ME versetzte Lysis Puffer direkt auf die Zellkulturschale pipettiert und die Suspension mit Qiashredder Säulen homogenisiert. Pro 9.5 cm^2 Fläche wurden 600 μl Lysis Puffer verwendet (auf 9.5 cm^2 wachsen ca. 1×10^6 Zellen mit ca. 15-35 μg RNA).

Auf jede Qiashredder Säule wurden 600 µl Homogenisat pipettiert und für 5 min zentrifugiert. Die Säule und das Pellet wurden verworfen, der Überstand in ein neues 1.5 ml Gefäß transferiert und mit dem gleichen Volumen 70 % Ethanol vermischt. Im nächsten Schritt wurde die RNA an die Silica-Gel basierte Membran der RNeasy Mini Säulen gebunden. Jeweils 600 µl wurde auf eine Säule gegeben und für 15 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Schritt mit dem übrigen Lysat-Gemisch wiederholt. Im folgenden Schritt wurde 350 µl Puffer RW1 auf jede Säule gegeben und für 15 s zentrifugiert. Die Säulen wurden dann in neue 2 ml Collection Tubes gesteckt. Es folgte ein Verdau mit DNaseI direkt auf der Säulenmatrix mit dem QIAGEN RNase-Free DNase Set. Dazu wurde eine Verdünnung mit Puffer RDD hergestellt. Pro Säule wurden 10 µl DnaseI mit 70 µl Puffer RDD gemischt, dieses Gemisch dann direkt auf die Membran der Säulen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde für 15 s zentrifugiert. Im letzten Waschschrift wurde je 500 µl Puffer RPE auf die Säule gegeben und für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Um die Säule restlos vom Puffer zu befreien, wurde abermals für 1 min zentrifugiert. Dann wurde die Säule in ein RNase-freies 1.5 ml Gefäß überführt. Die Elution erfolgt mit 40 µl RNase-freiem Wasser, welches direkt auf die Membran pipettiert wurde. Nach kurzer Inkubation wurde erneut für 1 min zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt. Die Ansätze wurden gepoolt, in 50 µl Aliquots verteilt und bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Analyse von Nukleinsäuren mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers

Um die Quantität und vor allem Qualität von Nukleinsäuren schnell und genau mit nur geringem Probenvolumen bestimmen zu können, wurden sie im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) untersucht. Der Bioanalyzer trennt Nukleinsäuren durch Kapillarelektrophorese in einem Chip mit mikro-fabrizierten Kanälen, die mit Gelmatrix befüllt wurden, auf und detektiert diese mit Hilfe eines fluoreszierenden interkalierenden Farbstoffes⁵². Der Bioanalyzer liefert die Daten sowohl als Funktion aus Migrationszeit und Fluoreszenzintensität, als auch als densitometrische Simulation, ähnlich einem Agarosegelphoto.

Die Probenmenge sollte für eine Qualitätskontrolle von gRNA zwischen 5 bis 500 ng/µl und für eine Quantifizierung bei 25-500 ng/µl liegen. Die Reproduktivität einer Quantifizierung liegt bei 10 % CV (Angaben des Herstellers).

Die Messung der RNA wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. RNA-Proben, die bei -80°C eingefroren waren, wurden, genauso wie der Marker (RNA 6000 Ladder; Ambion), für 2 min bei 70°C erhitzt. Frisch gewonnene gRNA wurde nicht erhitzt.

Der DNA 500 LabChip Kit wurde für die Auswertung von RT-PCR-Fragmenten verwendet. Dieser Kit kann für Fragmente zwischen 25 und 500 bp verwendet werden. Die Auflösung beträgt ± 5 bp (25-100 bp) bzw. ± 5 % (100-500 bp). Die Genauigkeit der Längeneinschätzung wird mit ± 15 %, die der Quantifizierung mit ± 30 % angegeben. Der Messbereich liegt zwischen 0.5 und 50 ng/ μ l (Angaben des Herstellers).

Maximale Salz-Konzentration in der Probe sollte 125 mM KCl bzw. NaCl und 15 mM für MgCl₂ nicht überschreiten.

Der DNA 500 LabChip Kit wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion) ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen⁵³.

Die PCR besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen durch Hitze
2. Primer-Annealing

Anlagerung von zwei chemisch synthetisierten strangspezifischen Oligonukleotiden an die komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA.

3. Polymerase-Reaktion (Extension)

Der durch Hybridisierung der Primer entstandene doppelsträngige Bereich dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase, mit deren Hilfe der Einzelstrang zum Doppelstrang aufgefüllt wird.

Mit Hilfe eines Thermocyclers und unter Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase, i.d.R. Taq-DNA-Polymerase (isoliert aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*), können diese Schritte maschinell erfolgen, ohne dass ständig die Temperatur kontrolliert und verändert werden oder neue DNA-Polymerase hinzugefügt werden müsste.

Ausbeute und Spezifität der PCR ist im starken Maße abhängig von den experimentellen Parametern, wie z.B. Art und Länge des Templates, den Konzentrationen der Bestandteile und Pufferbedingungen, der verwendeten DNA-Polymerase und dem Temperaturprofil. Effektivität und Spezifität können auch durch Zugabe von PCR-Beschleunigern wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) gesteigert werden.

Um die Spezifität zu steigern, wurde als Thermocyclerprogramm das Prinzip der „Touchdown-PCR“ (TD-PCR)⁵⁴ angewandt, wobei die Annealing-Temperatur (T_A) in den ersten drei Zyklen von Zyklus zu Zyklus um zwei Grad herabgesetzt wird, bis schließlich die eigentlich errechnete Temperatur erreicht wird. Hier wurde in den ersten drei Zyklen die Temperatur 6°, 4° bzw. 2°C über die T_A gesetzt. Für die Real-Time PCR wurde dieses Programm nicht verwendet.

Als Polymerase wurde Taq DNA Polymerase oder Platinum[®] Taq DNA Polymerase (beide Gibco BRL, Eggenstein) verwendet.

50 µl Reaktionsansatz:

		Konzentration im Ansatz
5 µl	10x PCR-Puffer	1x
5 µl	10 µM Primer 1	1 µM
5 µl	10 µM Primer 2	1 µM
5 µl	dNTP's (je 2 mM)	je 200 µM
1.5 µl	50 mM MgCl ₂	1.5 mM
0.25 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	2.5 U
ca. 100 ng gDNA, 0.5 ng Plasmid-DNA oder 2 µl cDNA (äquivalent 100 ng gRNA)		
Ad 50 µl mit H ₂ O		

Die verwendeten Thermocycler sind mit heizbaren Deckeln ausgestattet, so dass ein Übersichten mit Mineralöl nicht nötig war. Es wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA bzw. cDNA mitgeführt (Non-Template Control, NTC). In der RTD-PCR wurden pro Probe bzw. Standard in Triplikas bzw. Duplikas gemessen.

2.2.4 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR lassen sich RNA-Sequenzen spezifisch als DNA anreichern. Eine Genexpression auf der Stufe der RNA lässt sich so untersuchen. Selbst seltene Transkripte lassen sich anreichern und analysieren. Diese Methode ist deutlich sensitiver als andere RNA-Nachweisverfahren, wie z.B. der Northernblot.

Mit Hilfe viraler RNA-abhängiger DNA-Polymerasen, den Reversen Transkriptasen, wird zuerst eine cDNA (complementary DNA) aus gRNA oder mRNA hergestellt, welche, entweder als RNA-DNA-Doppelstrang oder als sscDNA (single strand complementary DNA; nach

RNase H-Behandlung), wie ein normales Template in die PCR eingesetzt wird. Die beiden gängigsten Polymerasen hierfür sind die AMV-RT (Avian Myeloblastis Virus) und die MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus)⁵⁵.

2.2.4.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription der gRNA aus humanem Lebergewebe wurde SuperscriptTM RNase H⁻ Reverse Transcriptase und SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, San Diego, USA) verwendet, beides Produkte einer klonierten MMLV-RT, deren RNase H-Sequenz deletiert wurde.

In einem RG wurden ca. 1 µg gRNA (5 µg / 100 µl RXN) mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 µg / ml), 1 µl dNTPs (10 mM jedes) und H₂O ad 12 µl gegeben und auf 65°C aufgeheizt. Nach 5 min wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt. Die Probe wurde kurz abzentrifugiert und folgende Zutaten zugegeben:

- 4 µl 5 x First Strand Puffer
- 2 µl 0.1 M DTT
- 1 µl RNase OUTTM Rekombinanter Ribonuclease Inhibitor (40 U / µl)

Die Temperatur wurde für 2 min auf 42°C equilibriert und 1 µl Superscript RT zugegeben. Nach einer Stunde bei 42°C wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 70°C inaktiviert.

Für die RT- und die RTD-PCR wurden von diesem Ansatz bis zu 3 µl eingesetzt.

2.2.5 Quantitative PCR

2.2.5.1 Real-Time Detection PCR (RTD-PCR)

Bei einer RTD-PCR wird die Menge des Templates während der PCR mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen in jedem Zyklus gemessen.

Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert oder ist an ein zusätzliches Oligonukleotid gebunden. DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe sind kostengünstiger im Vergleich zu Hybridisierungssonden, sind haben aber eine geringere Spezifität. Durch die Messungen der Templatmenge in jedem Zyklus ergibt sich ein Gesamtbild der PCR und eine generelle Bestätigung der Amplifikation. Russ Higuchi demonstrierte das Schlüsselprinzip der Real Time PCR unter Verwendung von Ethidiumbromid, welches 25 mal stärker fluoresziert, wenn es an dsDNA bindet. Heute stehen auch andere interkalierende Substanzen zu Verfügung, z.B. Sybr

Green (Molecular Probes, Eugene, USA), das im gebundenen Zustand 200 mal stärker fluoresziert als in Lösung^{56,57}.

In dieser Arbeit wurde als Thermocycler für die RTD-PCR der iCycler iQ von Biorad verwendet. In diesem Thermocycler ist eine Detektion der Fluoreszenz während der ablaufenden Reaktion (Real Time Detection) möglich.

Verwendet werden kann diese Technologie z.B. bei Expressionsanalysen, DNA/RNA Quantifizierung, Bestimmung viraler Titer, Mutationsanalysen (SNP), Genotypisierung, Geschlechtsbestimmung, Tierartenbestimmung oder GMO Analysen.

2.2.5.2 TaqMan[®] Assay

Der TaqMan Assay nutzt die 5' à 3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, um eine markierte Sonde während der Primer Extension zu zerschneiden⁵⁸. Am 5'-Ende ist die Sonde mit einem fluoreszierenden Reporter-Molekül markiert (z.B. Fluorescein), und am 3'-Ende mit einem anderen Fluorophor, meistens einem Tetramethyl-Rhodamin Derivat, welches als Quencher für den Reporter dient⁵⁹⁻⁶².

Es wurde der qPCR Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet. Als Polymerase dient in diesem Kit die Hot GoldStar-Polymerase, die einen Hotstart benötigt. Als Sonden wurden in dieser Arbeit 6-FAM und TAMRA markierte Oligonucleotide benutzt. Durch die Nähe der an den beiden Enden eines 20-30 nt langen Oligos fixierten Fluorophoren wird Energie vom nach Excitation angeregten Reporter auf den Quencher übertragen, ohne dass ein Photon emittiert wird. Dieser Effekt nennt sich Fluoreszenz (oder Förster) Resonanz Energie Transfer (FRET)⁶³. Die Effizienz des FRET ist abhängig von der umgekehrten sechsten Potenz des intermolekularen Abstands⁶⁴. Wenn die Sonde von der Polymerase während des Extensionsschrittes verdaut wird, ist die Nähe der beiden Fluorophoren zueinander aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporters kann gemessen werden. Diese wird vom iCycler in relativen Einheiten als „Relative Fluorescence Units (RFU)“ angegeben.

In den frühen Zyklen der PCR ist die ansteigende Fluoreszenz des Reporters nicht messbar, aber von einem bestimmten Punkt der Amplifikation an resultiert aus der Akkumulation des Produktes eine messbare Zunahme der Fluoreszenz. Als Threshold Cycle (C_T) wird der Zyklus der PCR bezeichnet, an dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt. Der C_T wird berechnet als durchschnittliche

Standardabweichung von der relativen Fluoreszenz der frühen Zyklen, multipliziert mit einem einstellbaren Faktor.

Neben TaqMan-Sonden gibt es noch eine Reihe anderer Systeme, die mit fluoreszenzmarkierten Oligos arbeiten, wie z.B. Molecular Beacons⁶⁵ oder Dual Oligo FRET Probes.

2.2.5.3 Design von Template, Primern und Sonden

Bei der Wahl der Primer und der Sonde wurde auf folgende Dinge geachtet:

Template Design

- Template ca. 75-150 bp Länge. Die Templatelänge korreliert mit der Effizienz der PCR, d.h. kurze Sequenzen lassen sich effizienter amplifizieren als lange
- T_A liegt unter der Schmelztemperatur aller Sekundärstrukturen des Templates
- GC-reiche Bereiche wurden nicht gewählt, GC Anteil sollte bei 50-60 % liegen
- es sollten nicht mehr als 4 Basenwiederholungen sein, dieses galt vor allem für G
- keine sich wiederholenden Sequenzmotive, z.B. Palindrome oder Inverted Repeats

Primer Design

- GC Anteil sollte dem PCR Produkt entsprechen und bei 50-60 % liegen
- Die Schmelztemperaturen sollten zwischen 50°C und 65°C liegen, ein Primerpaar sollte eine möglichst ähnliche T_m haben
- Sekundärstrukturen und Bereiche mit ungewöhnlichen Sequenzen, wie z.B. Polypurin oder Polypyrimidin oder sich wiederholende Sequenzmotive sollten vermieden werden.
- G's oder C's sollten am Ende der Primer sitzen
- Primer und Sonde wurden auf inter- und intrakomplementäre Sequenzen untersucht, damit es nicht zur Bildung von Primer-Dimeren und Hairpins kam
- Die Primer sollten nahe dem 3'-Ende binden, um RNA Degradierungen und eine ineffiziente reverse Transkription zu kompensieren.

Sonden Design

- Sonde sollte für eine effiziente Hydrolyse nahe an einem Primer binden
- T_m der Sonde sollte 5-10°C über der T_m der Primer liegen
- G wurde nicht an den Reporter Farbstoff gekoppelt bzw. generell wurden eine Sequenz mit möglichst wenigen G's gewählt, da diese einen Quenching Effekt haben.

Für das Design der Primer und der Sonde wurde die im Internet verfügbare Shareware Primer3 verwendet⁶⁶

http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

Die räumliche Struktur des Templates wurde mit Hilfe des ebenfalls online verfügbaren Programms Mfold auf eventuell störende Faltungen untersucht⁶⁷:

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>

Die Sequenz des Templates wurde auf Spezifität untersucht, indem sie mit einem Basic Local Alignment Search Tool mit anderen humanen Sequenzen verglichen wurde⁶⁸

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

2.2.5.4 Reaktionsbedingungen

		Stock	Endkonzentration
2.8 µl	PCR-Puffer	10x	1x
je 0.84 µl	Primer	10 mM	300 nM ¹
0.896 µl	Sonde	10 mM	320 nM
1.12 µl	dNTP's	je 5 mM	je 200 µM
1.96 µl	MgCl ₂	50 mM	3.5 mM
0.5µl	Hot GoldStar Enzym	5 U/µl	2.5 U
16.404 µl	H ₂ O		
3µl cDNA (äquivalent 150 ng RNA; für β-Actin Messungen wurde 1:10 verdünnt)			

2.2.5.5 RTD-PCR Programm und Plate-Setup

1x	10 min	95°C (Hot GoldStar Aktivierung)
40 x	15 s	95°C
	10 s	63°C
	30 s	55°C

Pro Platte standen 96 Wells zur Verfügung. Für jeweils sechs Proben konnten zwei Gene und ACTB in Triplets gemessen (3 x 6 x 3) werden, dazu die jeweiligen Standardkurven in Triplets und vier Verdünnungsstufen (3 x 3 x 4), und je zwei NTCs (2 x 3).

2.2.6 Interpretation der Daten

2.2.6.1 Passive Referenz und Hintergrund-Fluoreszenz

Der Reporter Farbstoff wird von der Software des iCyclers automatisch gegen eine passive Referenz, die nicht an der Reaktion teilnimmt, abgeglichen, um Schwankungen des Signals durch Wechsel in Volumen und Konzentration auszugleichen. Im qPCR-Kit steht hierfür beigemischt Carboxy-X-Rhodamin (ROX) zur Verfügung.

2.2.6.2 C_T-Wert

Die PCR wird durch eine Reihe Faktoren beeinflusst, die die Vermehrungsrate ständig ändern. In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, suboptimal, während in der dritten Phase der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Exponentiell bleibt eine PCR bei 12 bis 400 Ausgangskopien für ca. 30 Zyklen, bei 200 bis 3200 für 25 Zyklen und bei anfänglich 3200 bis 51200 für höchstens 20 Zyklen⁶⁹.

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase zu messen, wurde der C_T-Wert verwendet.

2.2.6.3 Interne Kontrolle

Da eine absolute Quantifizierung sehr aufwendig ist, wurde hier eine relative Quantifizierung durchgeführt. Dafür wurde eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle ist ein Gen, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dieses wird als Normalisierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments.

Die ideale interne Kontrolle ist leicht zu detektieren und dessen Expression sollte nicht variieren während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung (z.B. Stress, Medikamente, Krankheit). In dieser Arbeit wurde β -Actin als interner Standard ausgewählt.

2.2.6.4 Berechnung mit einer Standardkurve

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem C_T . Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den C_T konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (C_T - b)/m$ dieser Funktion kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden.

Alle Proben wurden normalisiert (GEN_n), indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wurde:

$$GEN_n = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$$

Es wurden relative Quantifizierungen durchgeführt, d.h. zwei Probengruppen wurden miteinander verglichen, nachdem die Targetmenge relativ zu einem Standard ermittelt wurde.

Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression :

$$GEN_n (\text{Gruppe A}) / GEN_n (\text{Gruppe B}) = n\text{-Fache Expression Gruppe A zu Gruppe B}$$

2.2.6.5 Erstellen der Standardkurven

Als Standard wurde das jeweilige PCR-Produkt kloniert, das entstandene Plasmid sequenziert und am Bioanalyzer quantifiziert. Es wurden Verdünnungen mit 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 und 2×10^3 Kopien/ μl hergestellt. Diese Angaben haben nicht den Anspruch, absolut zu sein, sondern stellen nur eine Abschätzung da, die der Orientierung dienen soll. Die Standardreihen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ein aufgetauter Aliquot wurde bei 4°C gelagert und nach zwei Wochen verworfen.

Die Standardkurven von BSEP, NTCP, OATP-C, MRP1 und MRP2 wurden mit $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ gDNA aus MDCKII-WT-Zellen und die Standardkurven für MRP3 und MRP6 wurden mit $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ gDNA aus Heringsperma (Gibco BRL, Eggenstein), equilibriert.

Da bei kleinen Konzentrationen signifikante Mengen DNA in Polypropylen-Gefäßen an der Wand haften bleiben können und adsorbierte, kurze Fragmente dazu neigen, zu denaturieren⁷⁰, wurde die Standardreihe in silikonisierten RG durchgeführt.

2.2.6.6 Berechnung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die Vermehrung des Templates in der PCR kann in einer vereinfachten Gleichung dargestellt werden:

$$X_n = X_0 \cdot (1+E_X)^n$$

X_n = Anzahl der Templatemoleküle bei Zyklus n

X_0 = Ausgangszahl der Templatemoleküle

E_X = Effizienz der Reaktion für Template X

n = Zykluszahl

Um mit Hilfe des C_T -Wertes eine Quantifizierung durchführen zu können, muss die Formel modifiziert werden:

$$X_T = X_0 \cdot (1+E_X)^{C_{T,X}}$$

X_T = Anzahl der Templatemoleküle beim C_T -Zyklus

X_0 = Ausgangszahl der Templatemoleküle

E_X = Effizienz der Reaktion für Template X

$C_{T,X}$ = Schwellenwertzyklus der Target Amplifikation

Durch Umwandlungen dieser Gleichungen kann die n-Fache Expression T_{AB} berechnet werden:

$$T_{AB} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

T_{AB} = n-Fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B)

$\Delta C_T = C_T \text{ Target} - C_T \text{ Referenz}$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Gruppe A} - \Delta C_T \text{ Gruppe B}$

2.2.6.7 Effizienz

Die Effizienz E wurde wie folgt mit Hilfe der Steigung m der Standardkurve berechnet:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung m von -3.32 würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten, -3.58 eine Effizienz von 90 %.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration wurde in Abhängigkeit von der Größe der zu erwartenden Fragmente gewählt, z.B. 0.6 % Agarose (w/v) für 1-20 kb und 1.2 % Agarose für 0.4-6 kb⁷¹.

Die jeweilige Agarosemenge wurde in 0.5 x TBE-Puffer oder 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 7.5 µl Ethidiumbromid-Lösung (0.5 mg / ml) pro 100 ml Agarosegel versetzt und zum Polymerisieren in den horizontalen Gelträger gegossen. Als Laufpuffer wurde der gleiche Puffer, der zum Aufkochen verwendet wurde, eingesetzt.

Die DNA-Proben und Marker wurden in 2x Blue Juice Gel Loading Buffer verdünnt. Für Fragmente aus der RTD-PCR wurde ein Auftragspuffer mit Xylencyanol FF gewählt, da dieser Farbstoff nicht mit den kurzen Fragmenten komigriert. Als Laufbedingungen wurden 120 V/40 mA gewählt. Die Sensitivität der Detektion ist sehr hoch; weniger als 10-20 ng Nukleinsäure pro Bande lassen sich nachweisen⁷².

2.2.8 Bakterienkultur

E. coli TOP 10F⁺ wurde in Luria-Broth-Medium (LB-Medium 1 % Bacto-Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7.5) und auf LB-Platten (LB-Medium mit 1.5 % Agar) gezüchtet.

80 µg/ml Ampicillin wurde zugesetzt, bei der Anzucht elektrokompenter Zellen wurde Tetracyclin zugesetzt (0.1 µg/ml). Flüssigkulturen wurden in Volumina von 500 µl, 5 ml oder 100 ml angezüchtet. Dafür wurde das Medium mit dem zu kultivierenden Bakterienklon steril angeimpft und dann bei 37°C unter Schütteln inkubiert (250 rpm).

Für die Anzucht der Bakterien auf Platten wurden 50 µl Bakteriensuspension in geeigneten Verdünnungsstufen mit einem Drigalskyspatel auf einer Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Kultivierung von Bakterien auf Platten bietet die Möglichkeit zum Blau-Weiß-Screening⁷³. Dazu wurden 85 mm Kulturplatten mit einer Mischung aus 2 µl IPTG (1 M) und 20 µl Xgal (20 mg/ml in DMSO) bestrichen, bevor die Bakterien ausplattiert wurden. IPTG ist ein Induktor des Lac-Operons und bindet an Stelle der Lactose an den Lac-Repressor, der daraufhin den Operator des β -Galactosidase-Gens freigibt und damit die Expression des α -Peptids ermöglicht.

2.2.9 Elektroporation von Plasmid-DNA⁷⁴

Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen durch kurze (10 μ s) elektrische Pulse hoher Feldstärke für DNA-Moleküle durchlässig gemacht⁷⁵.

40 μ l elektrokompente Bakterien wurden auf Eis kurz aufgetaut. Nach Zugabe von 5-10 ng präparierter Plasmid-DNA in einem Volumen von 5 μ l wurde 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser™ und Gene Pulse Controller™ (Biorad, Hercules, USA) unter folgenden Bedingungen:

- Widerstand $R = 400 \Omega$
- Kondensatorkapazität $C = 25 \mu\text{F}$ und
- Ausgangsspannung $U = 2.5 \text{ kV/cm}$.

Während der Elektroporation konnte eine Pulslänge von 7-9 ms auf dem Gene Pulser abgelesen werden. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und bei 37°C zur Stabilisierung und zur Ausbildung der Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenz⁷⁶ 30-45 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit LB-Medium verdünnt, je 20-50 μ l der verschiedenen Verdünnungen auf vorgewärmte, antibiotikahaltige LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA in relativ reiner Form für präparative Zwecke (Klonierung, PCR, Sequenzierung, Transformation) erfolgt die Plasmid-Midipräparation. Nach der alkalischen Lyse der Bakterienzellen wird das Plasmid-haltige Lysat unter definierten Salzbedingungen über spezielle Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt.

Für die Midipräparation wurde der QIAGEN-Plasmid-Midi-Kit und der Nucleobond® Kit AX 100 verwendet. Die Durchführungen erfolgten nach den Angaben der Hersteller.

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Extinktion bei 260 und 280 nm.

2.2.11 Zellkultur

2.2.11.1 Zellkulturhaltung

Alle verwendeten Zelllinien wachsen adhärent in üblichen Zellkultur-Gefäßen. Die Zellkultur wurde in 250 ml Flaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche und mit Filter (Greiner, Frickenhausen) gehalten. Sie wurden jeweils nach Erreichen von Konfluenz passagiert, indem zunächst das alte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gespült wurden. Daraufhin wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lsg. bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen z. T. abgelöst hatten. Durch Zugabe von 5 Volumenteilen Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellsuspension für 8 min bei 500 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1-5 x 10⁴ Zellen / cm² wieder ausgesät.

In regelmässigen Abständen wurden die Kulturen auf Kontamination durch Mycoplasmen untersucht, indem eine Färbung mit DAPI vorgenommen wurde.

Die Expression des Transporters in den transfizierten Zellkulturen wurde ebenso regelmässig im Westernblot und mit der RT-PCR überprüft.

2.2.11.2 Einfrieren von Zellkulturen in flüssigem Stickstoff

Für eine längerfristige Lagerung wurden die nach Trypsin-Behandlung pelletierten Zellen in 4 ml Einfriermedium [90 % FCS 10 % DMSO (v/v)] pro 75 cm² Wachstumsfläche resuspendiert und in zwei Aliquote aufgeteilt. Die Zellsuspensionen wurde in kältestabile Röhrchen überführt und in eine Einfrierbox (Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container) gestellt. Diese wurde über Nacht in einen -80 °C Gefrierschrank gelagert. Nach 24 h wurden die Zellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dauer-Dewar gelagert.

2.2.12 Messung des Transports durch Monolayer mit Hilfe von Transwells

Für die Messung des Transports von Immunsuppressiva durch Monolayer wurden MDCKII-Zellen, die MRP2 bzw. MDR1 überexprimieren, in Transwells (Costar Corning, Acton, USA) angezüchtet. Diese bestehen aus zwei Kompartimenten, die von einer porösen Membran geteilt werden. Es kamen dabei zwei verschiedene Transwell-Formate zum Einsatz:

- Transwell Clear, 12-Well, 3 µm Porengröße, 1 cm² Membran, 3426 (Costar, Acton, USA)
- Transwell Clear, 6-Well, 3 µm Porengröße, 4.7 cm² Membran, 3452 (Costar, Acton, USA)

Vor der Aussaat der Zellen in das obere Kompartiment wurden die Transwells mit DMEM Medium (mit 10 % FCS und Antibiotika) 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Es wurde in hoher Zelldichte ausgesät (5×10^5 Zellen/cm²). Die bewachsenen Transwells wurden nach dem 4. Tag nach Aussaat verwendet. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Ab 24 h vor Versuchsbeginn wurde Antibiotika-freies Medium verwendet. Das Medium wurde 2 h vor Versuchsbeginn nochmals gewechselt.

Die Membranen wurden einmal mit PBS und einmal mit auf 37°C vorgewärmtem Transportmedium (HBSS ohne Phenolrot, 5 mM Glucose und 12.5 mM HEPES) gewaschen. Die Akzeptor-Kompartimente wurden mit vorgewärmten Transportmedium befüllt. Das entsprechende Immunsuppressivum bzw. eine Kombination mehrerer wurde dem vorgewärmten Medium beigegeben und in die Donor-Kompartimente pipettiert. Für eine Transportstudie wurden die Transwells im 12-Well Format mit 1.5 ml im unteren Kompartiment und 0.5 ml im oberen Kompartiment befüllt (im 6-Well entsprechend 2.6 ml und 1.5 ml). Die Transwells wurden auf dem Wipptisch (Heidolph Polymax 1040) bei niedrigster Stufe im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jeden Messwert wurden 100 µl abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse verwahrt. Die abgenommene Menge wurde durch vorgewärmtes Transportmedium ersetzt.

2.2.12.1 Messung der Trans Epithelial Electric Resistance (TEER)

Neben der mikroskopischen Kontrolle wurde die Integrität des Monolayer durch Messung der TEER bestätigt. Die Messung wurde mit dem EVOMTM (WPI), ausgerüstet mit einer STX-2 Elektrode, durchgeführt (WPI, Sarasota, USA). Zuvor wurde die Funktion des EVOMTM mit Messungen in 10 mM und 100 mM KCl-Lsg. überprüft bzw. bei Bedarf justiert. Die Elektrode wurde vor Beginn und zwischen den Messungen in 70 %igen Ethanol sterilisiert und in Medium gewaschen.

Der Widerstand der zellfreien Transwells, gefüllt mit Medium, wurde gemessen

$$R \text{ (Lösung + Membran)} = R_M$$

Dieser Wert R_M wurde von dem Gesamtwiderstand R_G abgezogen

$$R \text{ (Lösung + Membran + Zellen)} = R_G$$

$$R_G - R_M = \text{Widerstand der Zellen (} R_Z \text{)}$$

Dieser Widerstand ist umgekehrt proportional zur Fläche, daher:

$$R_Z \cdot \text{Fläche} = R_Z \cdot \pi \cdot r^2 = R_Z \cdot \pi \cdot d^2 / 4 = \Omega \text{cm}^2$$

Für die Transwells im 12-Well Format wurde ohne Zellen ein Widerstand von ca. 95 Ω gemessen. Ein Monolayer wurde als Konfluent erklärt, wenn der Widerstand R_Z folgende Schwellenwerte überschritten hatte: MDCKII-WT, -MRP1, -MRP2 und -MRP3 55 Ωcm^2 , MDCKII-MDR1 155 Ωcm^2 und Caco-2 25 Ωcm^2 .

2.2.12.2 Korrektur der Messwerte

Die für die Messungen abgenommene Menge wurde rechnerisch wie folgt ersetzt: Die Messung zum Zeitpunkt T_1 entsprach T_1 . Zu dem Messwert T_2 wurde $T_1/5$ hinzuaddiert. Zu T_3 wurde $T_1/5$ und $T_2/5$ addiert. Entsprechend wurde so für alle Messwerte verfahren. Diese Korrektur ist für die Berechnung der Permeabilität von großer Wichtigkeit.

2.2.12.3 Netto-Fluxion

Die Netto-Fluxion des von basal nach apikal stattfindenden Transports wurde berechnet, indem die transportierten Substratmengen voneinander abgezogen wurden:

$$[c_n] \text{ B to A} - [c_n] \text{ A to B}$$

$$[c_n] = \text{Konzentration des Substrats zum Zeitpunkt } n$$

$$\text{B to A} = \text{Transport von basal nach apikal}$$

$$\text{A to B} = \text{Transport von apikal nach basal}$$

2.2.12.4 Transport P_{app} und Transportrate

Der scheinbare (englisch: apparent) Transport P_{app} [cm/s] wurde nach der Formel von Artursson berechnet:

$$P_{app} = dQ/dt \cdot (A C_0)^{-1}$$

$$P_{app} = \text{apparenter Transport [cm/s]}$$

$$dQ/dt = \text{Anstieg der Menge des Substrats in dem Akzeptor-Kompartiment pro Zeit [ng/s]}$$

$$A = \text{Fläche des Transwells [cm}^2\text{]}$$

$$C_0 = \text{Anfangskonzentration des Substrats in dem Donor-Kompartiment [ng/ml]}$$

Indem der P_{app} (A to B) durch den P_{app} (B to A) geteilt wurde, konnten die Transportrate bestimmt werden:

$$\text{Transportrate} = P_{app} \text{ (A to B)} / P_{app} \text{ (B to A)}$$

2.2.13 Quantifizierung von Immunsuppressiva

Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus wurden mit Hilfe einer integrierten On-Line Solid Phase Extraction - High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS; siehe Abb. 2.1) gemessen. Diese Technik detektiert eine spezifische Masse im SIM (single ion monitoring) Modus oder unterschiedliche Massen im MRM (multiple reaction monitoring) Modus, ohne durch Matrixeffekte gestört zu werden, wie dieses im ELISA oder Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) der Fall ist. Die Immunsuppressiva können somit nicht nur in Blutproben bestimmt werden, auch der Gehalt in Zellkulturüberständen kann bestimmt werden. Die Vorteile dieses Systems sind die simultane und sensitive Bestimmung unterschiedlicher Substanzen im MRM-Modus des MS/MS-Systems, eine kurze Analysezeit und einfache Probenvorbereitung.

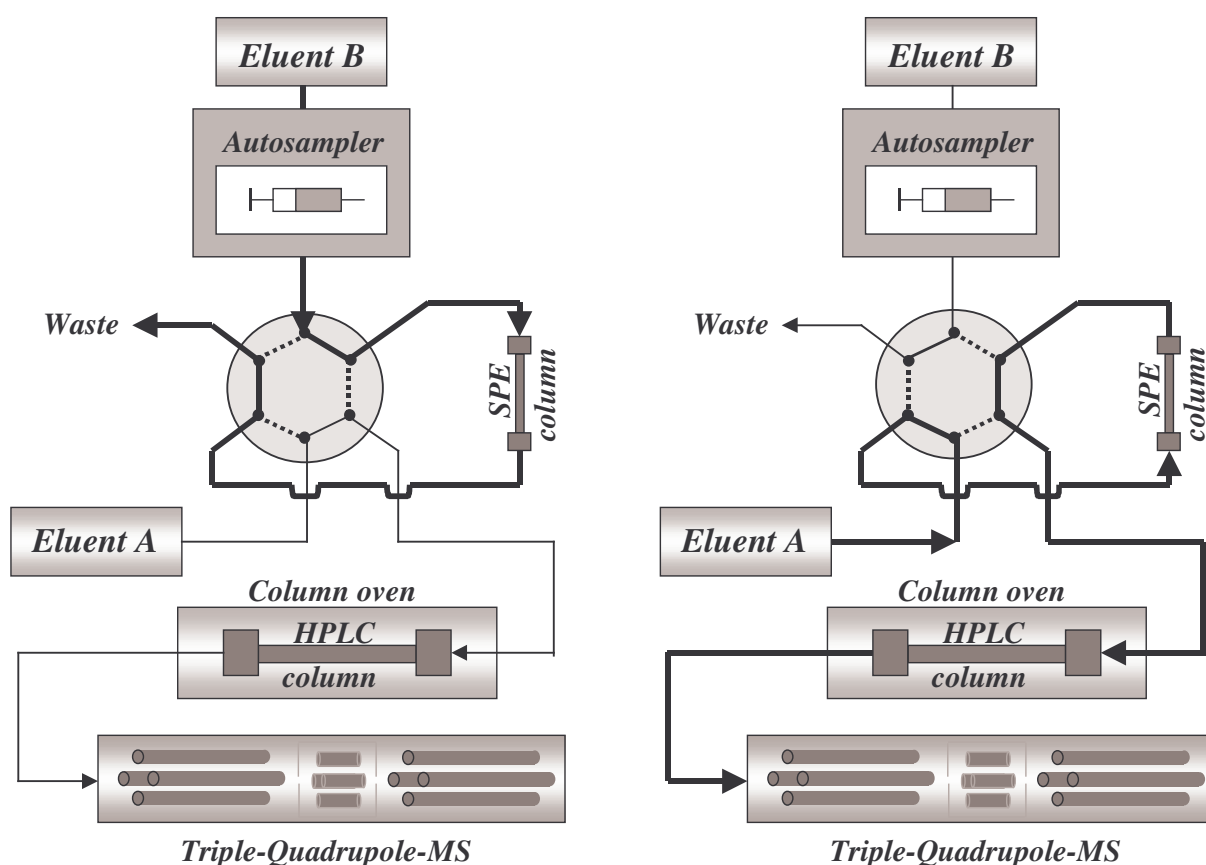


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des on-line SPE-HPLC-MS/MS. Links Probenanreicherung und Waschschrift; rechts Elution des Analyten, Übertragung auf die HPLC-Säule und Messung durch Atmospheric Pressure Ionisation Tandem Mass Spectroscopy (API-MS/MS).

Die abgenommenen 100 µl Probenvolumen wurden in 200 µl Fällungsreagenz (100 % Methanol / 0.2 M ZnSO_4 (80/20 v/v), versetzt mit 20 ng/ml Ascomycin und 100 ng Ciclosporin D) aufgenommen. Dann wurden die Proben für 20 s gevortext und 15 min bei 20800 g und 4°C zentrifugiert. 150 µl des Überstandes wurden in eine 96-Well Platte überführt und in einen temperaturkontrollierten (20°C) Autosampler gestellt. Die Anreicherung der Analyte erfolgt in der SPE-Säule (Poros R1/20, 2.1 x 30 mm, 20 µm Partikel Größe, Applied Biosystems, Darmstadt), gefolgt von einem Waschschriff mit Eluent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 50/50 (v/v); siehe Abb. 2.1 links). Elution mit Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 97/3, 10 mM NH_4OAc , 0.1 % Acetat) und transfer zur HPLC-Säule erfolgte durch Umschalten der Ventile (rechte Seite in Abb. 2.1). Zur HPLC-Auftrennung wurde eine kurze Phenyl-Hexyl-Säule verwendet (Phenomenex Luna 5 µm Phenyl Hexy, 2 x 50 mm, Aschaffenburg). Das API 3000 Massenspektrometer (Triple Quadrupole, Applied Biosystems / MDS Sciex Concord, Canada), ausgerüstet mit einer TurboIonspray® Quelle (ESI), erlaubte eine sehr selektive und sensitive Detektion im MRM-Modus.

2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird unter Bedingungen durchgeführt, die die Dissoziation der Proteine in ihre individuellen Untereinheiten garantieren und ihre Aggregation minimieren. Dazu wird das stark negativ geladene Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) in Verbindung mit einem reduzierenden Agens und Wärme eingesetzt. Das denaturierte Protein bindet SDS und wird dadurch negativ geladen. Da die Menge des gebundenen SDS fast immer proportional zu dem Molekulargewicht der Proteine ist, wandern die SDS-Polypeptid Komplexe durch das Gel in Übereinstimmung mit der Größe des Proteins. Mit Hilfe von Proteinen bekannter Größe kann so die Größe des fraglichen Proteins abgeschätzt werden. Dabei müssen Modifikationen des Polypeptids, z.B. N- oder O-Glykosylierungen, mit beachtet werden, da sie einen signifikanten Einfluss auf das scheinbare Molekulargewicht haben.

In dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Laemmli-Gelsystem mit Tris-Glycin-Puffern verwendet, bei dem die Proben zuerst in einem Sammelgel konzentriert und dann im Trenngel aufgetrennt wurden⁷⁷.

Die Konzentration der Proteine wurde nach der Methode von Bradford⁷⁸ bestimmt. Dabei bildet Coomassie Brilliant Blue G-250 mit Proteinen Farbstoffkomplexe, was das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschiebt.

Formulierungen der eingesetzten Puffer und Lösungen

Trenngel (1.5 mm Spacer: 15 ml für zwei Gele)

	10 %	7.5 %	6 %
H ₂ O	5.9 ml	7.15 ml	7.9 ml
30 % Acrylamid-Mix	5 ml	3.75 ml	3.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.8 ml		
10 % SDS	150 µl		
10 % Ammoniumpersulfat	150 µl		
TEMED	12 µl		

Sammelgel (1.5 mm Spacer, 4 %: 6 ml für zwei Gele)

H ₂ O	3.55 ml
30 % Acrylamid-Mix	0.8 ml
0.5 M Tris (pH 6.8)	1.5 ml
10 % SDS (w/v)	60 µl
10 % Ammoniumpersulfat (w/v)	60 µl
TEMED	6 µl

2x Probenauftragspuffer:

0.5 M Tris (pH 6.8)	2 ml
Glycerol (87 %)	1.6 ml
10 % SDS (w/v)	3.2 ml
2-Mercaptoethanol (β-ME)	800 µl
1 % Bromophenolblau	400 µl

5x Laufpuffer:

Tris Base	15.1 g (25 mM)
Glycin	72 g (192 mM)
dH ₂ O	900 ml
50 ml 10 % SDS (w/v)	0.1 %
mit dH ₂ O	ad 1000 ml

Die Elektrophorese wurde in einer Minigel-Elektrophoresekammer (befüllt mit Laufpuffer) durchgeführt. Die Glasplatten wurden vor dem Zusammenbau mit Ethanol gereinigt. Das Trenngel wurde bis ca. 2.5 cm unter den oberen Rand in die Gelkammer gegossen und vorsichtig mit 0.1 % SDS oder, bei Gelen über 8 %, mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Oberfläche des Trenngels mit H₂O gewaschen, kurz getrocknet und mit dem Sammelgel (4 %) überschichtet. Vor der Polymerisation wurden die Probenkämme eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer für SDS-PAGE versetzt, entweder für 5 min bei 100°C oder bei Membranproteinen, da diese beim Kochen mit SDS und β -ME oft aggregieren, bei 37°C für 30 min denaturiert und auf das Gel aufgetragen (Proteinmenge pro Tasche ca. 5-50 μ g). Zellkulturen wurden direkt in der Zellkulturflasche bzw. im Well mit Probenauftragspuffer lysiert. Nicht benutzte Wells wurden mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V bis zum Auslaufen der Lauffront in den Elektrophorese-Puffer. Die SDS-Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder geblottet.

2.2.15 Western Blot

Beim Westernblot werden Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran übertragen. Proteinbanden können dann auf der Membran identifiziert werden, z.B. mit Hilfe spezifischer Antikörper^{79,80}.

In dieser Arbeit wurde eine Nitrozellulose-Membran benutzt, die die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet (Hybond™-ECL, 30 cm x 3 m von Amersham, Little Chalfont, UK). Sie besitzt eine hohe Protein-Bindekapazität und eignet sich für Immunfärbungen, ist dafür aber mechanische und chemische unbeständig.

Vom SDS-Polyacrylamid-Gel wurde das Sammelgel abgetrennt. Geblottet wurde nach der Sandwich-Methode in der Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Biorad). Die Halterkassette mit dem Trenngel wurde den Angaben des Herstellers entsprechend zusammengesetzt und der Proteintransfer für 70 min bei 100 Volt und 300 mA oder über Nacht bei 30 V und 90 mA durchgeführt. Der Prestained Marker diente als optische Kontrolle für den Transfer der Proteine auf die Membran. Nach dem Blotten wurde das Trenngel zur Kontrolle des vollständigen Transfers mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Nach dem Westernblot wurde eine Immunfärbung der Nitrozellulosemembranen durchgeführt.

Transfer Buffer (pH 8.3):

Tris Base	3.03 g (25 mM)
Glycin	14.4 g (192 mM)
Methanol (z.A.)	200 ml (20 % v/v)
10 % SDS (w/v)	10 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

2.2.16 Coomassie Brilliant Blue Färbung von SDS-Gelen

Diese Färbemethode detektiert ca. 0.2-0.4 µg Protein/0.5 cm Bande. Die Variabilität der Färbung ist relativ gering.

Gefärbt wurde in Coomassie-Lsg. (45 ml Methanol, 45 ml H₂O, 10 ml Eisessig, Coomassie Brilliant Blue R250 0.025 g) für mindestens 4 h. Entfärbt wurde in Entfärber-Lsg (40 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure, 50 ml H₂O). 5 h, wobei diese 3 bis 4 mal gewechselt wurde.

2.2.17 Ponceau-S-Färbung

Auf eine Membran geblottete Proteine können mit Ponceau-S rot angefärbt werden. Die Sensitivität der Ponceau-S-Färbung liegt auf Nitrozellulosemembranen bei 50-150 ng Protein/0.5 cm Bande.

Die Zellulosenitratmembran wurde für 2 min in einer 2 %igen Ponceau-S-Lösung angefärbt und unter fließenden Wasser entfärbt. Einzelne Proteinbanden können markiert werden.

Ponceau S Lösung

Ponceau S	0.2 g (0.2 %)
Trichloressigsäure	3 g (3 % w/v)
H ₂ O	ad 100 ml

2.2.18 Immunfärbung von Nitrozellulosemembranen

Mit Hilfe von Antikörpern können Antigene, gebunden auf einer Zellulosemembran, detektiert werden. Das Prinzip der Immunfärbung beruht darauf, dass der Blot zuerst mit anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert wird, gewaschen wird und anschliessend der Primärantikörper mit einem markierten Antikörper, der an den Primärantikörper bindet (Sekundärantikörper), nachgewiesen wird. Die Spezifität des Nachweises hängt stark von der Qualität der Antikörper und der Verdünnungsstufe dieser ab⁸¹.

Zuerst werden freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran in 5 % Milchpulver, BSA oder Blockingreagenz in PBS-T für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Zur Optimierung der Antikörper-Konzentrationen wurde der Blot vor dem Blocken in Streifen geschnitten.

Alle folgenden Schritte werden bei RT auf dem Wipptisch durchgeführt. Gewaschen wurde erst einmal kurz, dann einmal für 15 min und zweimal für 5 min mit PBS-T (PBS mit 0.1 % Tween 20). Der Primärantikörper wurde für 1 bis 3 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in 1 % Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal 5 min in PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem in 1 % Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper erfolgt für 1 h. Die Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und steht nun für den Protein-Nachweis mit ECL-Färbung bereit.

2.2.19 ECL-Färbung von Westernblots

Trägt der Sekundärantikörper Peroxidase als Markierung, kann die ECL-Färbung eingesetzt werden. Peroxidasemarkierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen und lösen dadurch Chemilumineszenz aus. Das dabei entstehende Licht mit einem Emissionsmaximum bei 428 nm wird über einen Film (Hyperfilm™ ECL, 18x24 cm, Amersham, Little Chalfont, UK) gemessen⁸². Verstärkt wird dieser Effekt durch Enhancer, wie z.B. Phenole. Das ECL-Verfahren ist 10 mal sensitiver als colorimetrische oder radioaktive Nachweissysteme (Angabe des Herstellers). In dieser Arbeit wurde das „ECL Western blotting detection reagents and analysis kit“ von Amersham benutzt.

Die Reaktion ist durch densitometrische Messung des Films quantifizierbar, da die Proteinmenge linear mit dem emittierten Licht korreliert⁸³. Dafür wurde erst der Film in der Gel Doc 2000 (Biorad, Hercules, USA) dokumentiert und mit der Software PCBAS 2.09 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) densitometrisch ausgewertet.

2.2.20 Stripping und Reprobing von Westernblots

Gestrippt wurde in Stripping-Puffer (100 mM β -ME, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) für 30 min bei 50°C. Danach wurde zweimal 10 min in PBS-T gewaschen und erneut für eine Stunde geblockt (5 %)⁸⁴.

2.2.21 Immunhistologie

Zelllinien wurden für die Immunfärbung auf runden Deckgläsern mit 12 mm Durchmesser wachsen gelassen und darauf angefärbt. Für die Inkubation sind pro rundes 12 mm Deckglas ca 25 µl nötig

Für die Immunhistologie wurden Kryoschnitte am Mikrotom HM 500 OM (Microm, Walldorf) von in Tissue-Tec O.C.T.TM Compound eingebettetem Gewebe durchgeführt.

Alle Antikörperverdünnungen wurden in PBS durchgeführt.

Die optimale Konzentration des 1. und des 2. Antikörpers muss mit Konzentrationsreihen angepasst werden, wobei vor allem der 1. Antikörper grossen Konzentrationsschwankungen unterworfen ist. Als Orientierungspunkt dienten die Angaben der Herstellerfirmen.

Um ein Eintrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die Präparate bei Inkubation mit dem 1. und 2. Antikörper in einer feuchten, geschlossenen Kammer gelagert. Bei Immunfluoreszenz wurden alle Waschschritte und Inkubationen in Dunkelheit durchgeführt.

Es wurden zwei Kontrollen mitgeführt:

- 1) ohne ersten AK, mit zweitem AK (dafür PBS)
- 2) ohne ersten und zweiten AK (dafür PBS)

2.2.21.1 Die eingesetzten Antikörper und ihre Verdünnungsstufen

Primäre Antikörper

Antigen	Name	Literatur	Isotyp	Verdünnung
MRP1	MRPr1	^{85,86}	Rat IgG2a	WB 1:200, IF 1:50
MRP2	M ₂ III-6	^{23,87}	Mouse IgG2a	WB 1:200, IF 1:50
MRP3	M ₃ II-9	⁸⁷	Mouse IgG1	WB 1:200, IF 1:50
MRP6	M ₆ II-31, M ₆ II-7	⁸⁸	Rat IgG2a	WB 1:200, IF 1:50
MDR1	C219, C494	^{89,90}	Mouse IgG2a	WB 1:200, IF 1:50
MDR3	P ₃ II-26	⁹¹	Mouse IgG2b	WB 1:200, IF 1:50
OATP-C	ESL	¹⁶	Rabbit IgG	WB 1:200, IF 1:50-100
BSEP	K24	⁹²	Rabbit	WB 1:1000-2000
NTCP	K9	⁹³	Rabbit	WB 1:500-1:2000, IF 1:50-100
ZO-1	Z-R1	^{94,95}	Rabbit polyclonal	IF 1:100
Actin	C-11		Goat polyclonal	WB 1:2000

Die Antikörper gegen MRP1 bis MRP6 und MDR1 bzw. MDR3 wurden von Alexis Biochemicals, Grünberg, erworben.

Die Antikörper gegen BSEP und NTCP wurden freundlicherweise von Prof. Dr. B. Stieger, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie am Universitätshospital Zürich, der Antikörper ESL gegen OATP-C von der Arbeitsgruppe um Prof. Dietrich Keppler, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Sekundäre Antikörper HRP-markiert

Rabbit Anti-Rat, HRP-Linked Polyclonal Antibody	(Dako, Glostrup, DK)
Goat Anti-Mouse, HRP-Linked	(Amersham, Little Chalfont, UK)
Goat Anti-Rabbit, HRP-Linked	(Amersham, Little Chalfont, UK)
Goat Anti-Rat, HRP-Linked whole Antibody	(Amersham, Little Chalfont, UK)

Sekundärantikörper, Fluoreszenz-markiert

	Excitation maxima	Emmission maxima
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgM (μ chain)	491 nm	515 nm
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	491 nm	515 nm
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	585 nm	610 nm
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rat IgG (H+L)	585 nm	610 nm

Fluoreszenz-markierte Antikörper wurden von Molecular Probes, Eugene, USA, erworben.

2.2.21.2 Durchführung

Es wurden zwei Fixierungen angewendet:

Methanol-Aceton-Fixierung:

5-10 min	Methanol (100 %) bei -20°C
10-20 s	Aceton (100 %) bei -20°C
3 x 5 min	PBS

Paraformaldehyd-Fixierung:

15 min	4 % Paraformaldehyd in PBS
3 x 5 min	PBS
3 min	0.2 % Triton-X 100
3 x 5 min	PBS

Der erste Antikörper wurde wie oben erwähnt verdünnt. 50 µl wurden pro Probe verwendet. Für mindestens 1 h bei RT wurde inkubiert oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde dreimal mit PBS für 5 min gewaschen.

Der zweite Antikörper (fluoreszenzmarkierte) wurde 1:100 verdünnt und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS für 5 min gewaschen. Darauf folgte bei Immunfluoreszenzfärbungen noch eine DAPI-Färbung der Zellkerne. Die DAPI-Gebrauchslösung (1 µg/ml) wurde für 15 Min bei RT auf den Präparaten gelassen und dann mit PBS (3 x 5 min) abgewaschen.

Die Objekte wurden mit Mowiol bzw. Immu-Mount (Thermo Shandon, Pittsburgh) eingedeckelt.

Immunfluoreszenzen wurden mit dem BX40 mit Omega Optical Filter XF56 (Olympus, Hamburg), ausgestattet mit einer Digitalkamera (INTAS, Göttingen) und der Software MagnaFire Camera Imaging and Control Version 1.1 (Optronics, Goleta, USA), durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 PCR-Optimierung

3.1.1 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität und Quantität der extrahierten RNA wurde im Bioanalyzer überprüft. Der Bioanalyzer nutzt Nukleinsäure-bindende Fluoreszenzfarbstoffe und Kapillargelelektrophorese zur schnellen quantitativen und qualitativen Bestimmung von Nukleinsäuren. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Leiter verwendet, bei der die Konzentrationen der einzelnen Banden bekannt ist, die Qualität wurde durch Lage, Anzahl und Höhe der Peaks, sowie der rRNA Rate (28S/18S) bestätigt.

Alle untersuchten Proben waren sowohl im Dotplot (Abb. 3.1), als auch im computergenerierten Agarosegel-ähnlichen Bild (Abb. 3.2) einwandfrei: keine der Proben war sichtbar andegradiert, da die 18S und 28S rRNA deutlich als scharfer Peak zu sehen waren; eine starke Kontamination durch genomische DNA, die als zusätzlicher, flacher Peak zu sehen gewesen wäre, konnte ausgeschlossen werden.

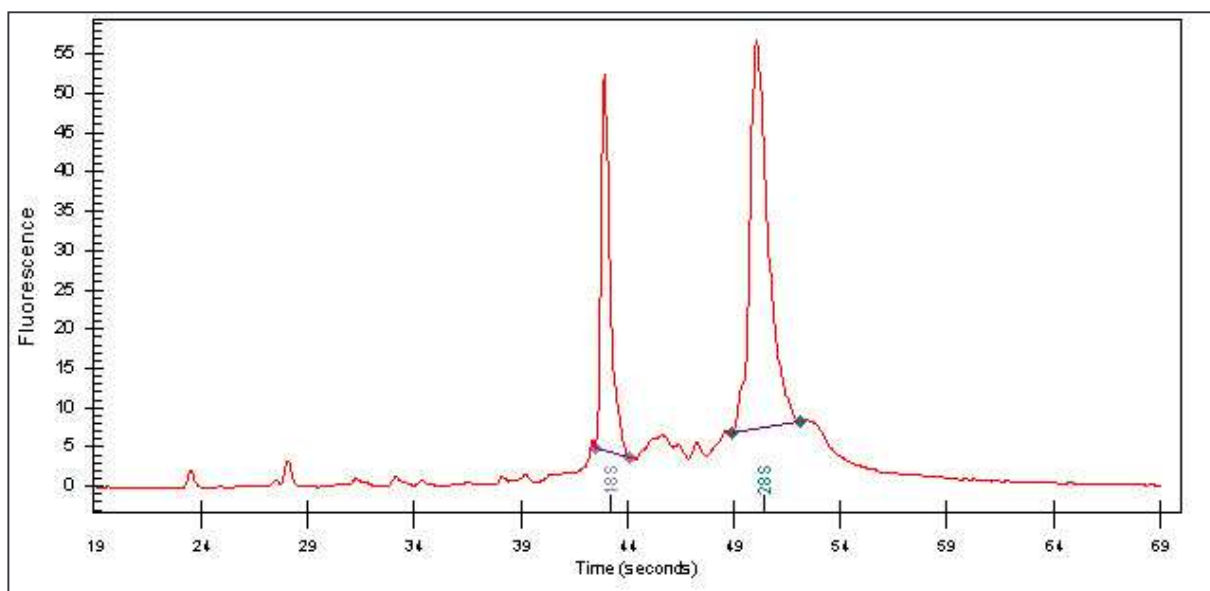


Abb. 3.1: Dotplot-Darstellung des Bioanalyzer einer typischen RNA-Probe; deutlich zu sehen sind die Peaks der 18S und 28S rRNA. Andegradierte RNA hätte breitere und flachere Peaks, genomische DNA würde als zusätzlicher, breiter Peak rechts neben dem 28S-Peak auftauchen.

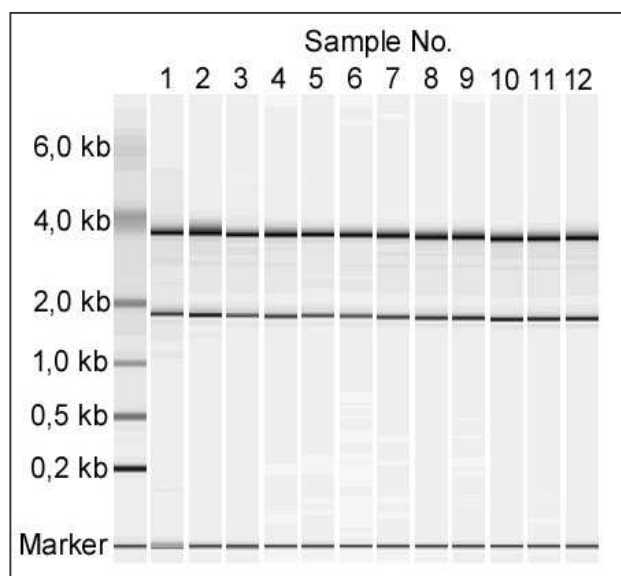


Abb. 3.2: Darstellung von aus humanem Lebergewebe gewonnen RNA-Proben als Agarosegel-ähnliches Bild mit dem Bioanalyzer. Die obere Bande ist die 28S rRNA (4718 bp), die mittlere die 18S rRNA (1874 bp). Die 28S rRNA läuft aufgrund ihrer komplexen Struktur noch vor der 4 kb-Bande.

Eine Test-Amplifikation der RNA-Proben (20-200 ng / 28 µl Reaktionsmix) in der RTD-PCR ergab für β -Actin (ACTB), MRP2 oder MRP6 weder ein Signal, noch ein PCR-Produkt; daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Verunreinigung durch genomische DNA die RTD-PCR beeinflusst. Nach einem Jahr Lagerung bei -80°C und zweimaligem Auftauen und Einfrieren war die RNA von allen hierfür untersuchten Proben ($n=16$) ebenfalls einwandfrei. Die RNA-Ausbeute betrug ca. 3 µg RNA pro mg Lebergewebe. Das rRNA-Verhältnis (28S/18S) betrug 1.68 ($\text{SD} \pm 0.2$). Bei HepG2-Zellen war die Ausbeute ca. 30 µg / 10^6 Zellen mit einer Ratio von 1.52 ($\text{SD} \pm 0.21$), bei Huh7-Zellen 16 µg / 10^6 Zellen mit einer Ratio von 1.63 ($\text{SD} \pm 0.18$).

3.1.2 Quantifizierung von DNA im Bioanalyzer

PCR-Fragmente, die mit dem QIAquick PCR Extraction Kit aufgereinigt worden waren, wurden für die Herstellung einer Standardkurve quantitativ im Bioanalyzer bestimmt. Im Dotplot (Abb. 3.3) und im Agarosegel-ähnlichem Bild (Abb. 3.4) waren alle untersuchten Fragmente als einzelne scharfe Banden zu sehen, d.h. kein Nebenprodukt ähnlicher Länge wurde mit aufgereinigt. Die im Bioanalyzer gemessenen Konzentrationen lassen sich mit der relativen optischen Dichte der Banden im Agarosegel korrelieren ($R^2 = 0.9864$; Abb. 3.5).

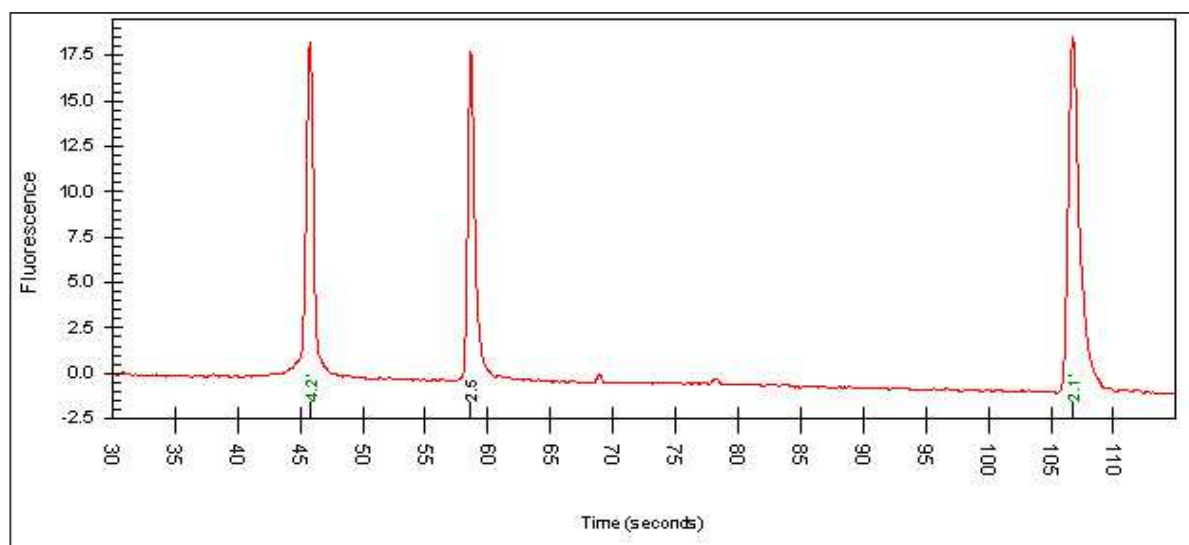


Abb. 3.3: Ein Elektropherogramm vom PCR-Fragment von OATP-C. Die Peaks links und rechts zeigen den unteren und oberen Marker, der mittlere Peak ist das PCR-Produkt.

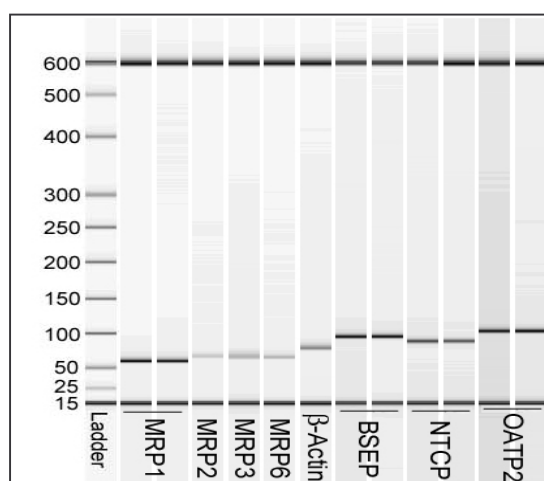


Abb. 3.4: Die im Bioanalyzer gemessenen PCR-Fragmente als computergeneriertes Agarosegel-ähnliches Bild. Die oberste und unterste Bande sind Marker, die jeder Probe beigegeben werden, um die Proben auszurichten.

Die links dargestellte Leiter (Ladder) dient zur Längenabschätzung und Quantifizierung der Banden der DNA-Proben. Die aufgereinigten RTD-PCR Fragmente von MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, ACTB, BSEP, NTCP und OATP2 (OATP-C) sind von links nach rechts dargestellt.

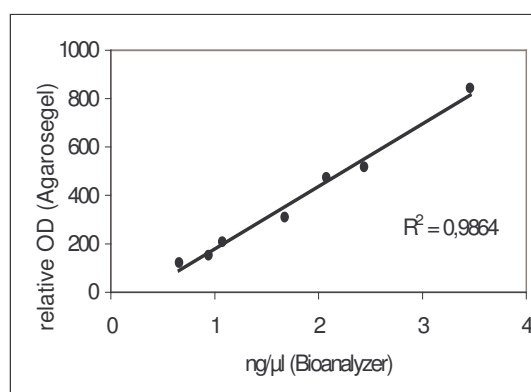
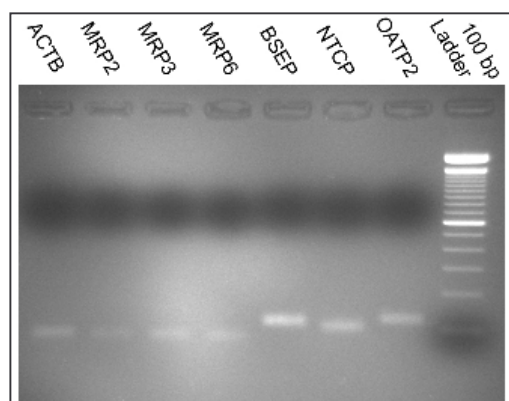


Abb. 3.5: Eine RT-PCR für ACTB, MRP2, MRP3, MRP6, BSEP, NTCP und OATP-C; die aufgereinigten PCR-Produkte wurden im Agarosegel photodensitometrisch bestimmt (links) und mit den im Bioanalyzer gemessenen Konzentrationen verglichen (rechts).

Die gemessenen Längen stimmen jedoch nicht mit der theoretischen (und im Agarosegel bestätigten) Länge überein (Tab. 3.1). Sie unterschreiten um ca. 10 bis 15 % die reale Länge. Wahrscheinlich bilden die PCR-Fragmente Sekundärstrukturen, die ihre Laufeigenschaften im Gel verändern. Daher sollte der Bioanalytiker zumindest bei kurzen Fragmenten bis 120 bp nicht für die Längenbestimmung benutzt werden. Dieses spielt aber in der PCR keine Rolle.

PCR-Fragment	gemessene Länge [bp]	reale Länge [bp]
ACTB	78	85
BSEP	96	111
MRP1	61	70
MRP2	68	80
MRP3	67	76
MRP6	66	76
NTCP	105	118
OATP2	89	100

Tab. 3.1: Vergleich der gemessenen (n=4) und der realen Fragmentlängen: die gemessenen Längen waren um 9 bis 15 % kürzer als die realen Fragmente.

3.1.3 Templatemenge

Wenn cDNA äquivalent 150 ng RNA pro 28 µl Reaktionsmix eingesetzt wurden, konnte ein C_T -Wert zwischen 22 bis 30 für alle RTD-PCRs gemessen werden. Der C_T -Wert von MRP1, dass in der Leber nur schwach exprimiert wird, liegt ausserhalb dieses angestrebten Bereichs. Durch den Einsatz einer größeren Template-Menge kann dieses Problem nicht gelöst werden, da dieses zu einer Inhibition der PCR führen würde. In Tabelle 3.2 finden sich die C_T -Werte, die in 30 Messungen ermittelt wurden.

Um Konzentrationsschwankungen in der RNA-Menge auszugleichen („normalisieren“ der Proben), wurde β -Actin (ACTB) als „Housekeeping“-Gen gewählt.

Transporter	MRP1	MRP2	MRP3	MRP6	BSEP	NTCP	OATP-C
C_T	30.3	23.3	29.1	26.5	28.1	22.3	23.0

Tabelle 3.2: ermittelte C_T -Werte bei Einsatz von äquivalent 150 ng RNA in der RTD-PCR (n=30).

3.1.4 Optimierung von Temperatur und $MgCl_2$ -Konzentration

Auf Grund der Kürze der Fragmente reicht für eine Denaturierung 15 sec bei 95°C aus und die Elongation kann während der Abkühl- und Aufheizphasen zwischen Annealing und Denaturation erfolgen (Two-Step PCR). Die Primer und Sonden der einzelnen Gene wurden so ausgewählt, dass sie bei der gleichen Annealing-Temperatur verwendet werden können.

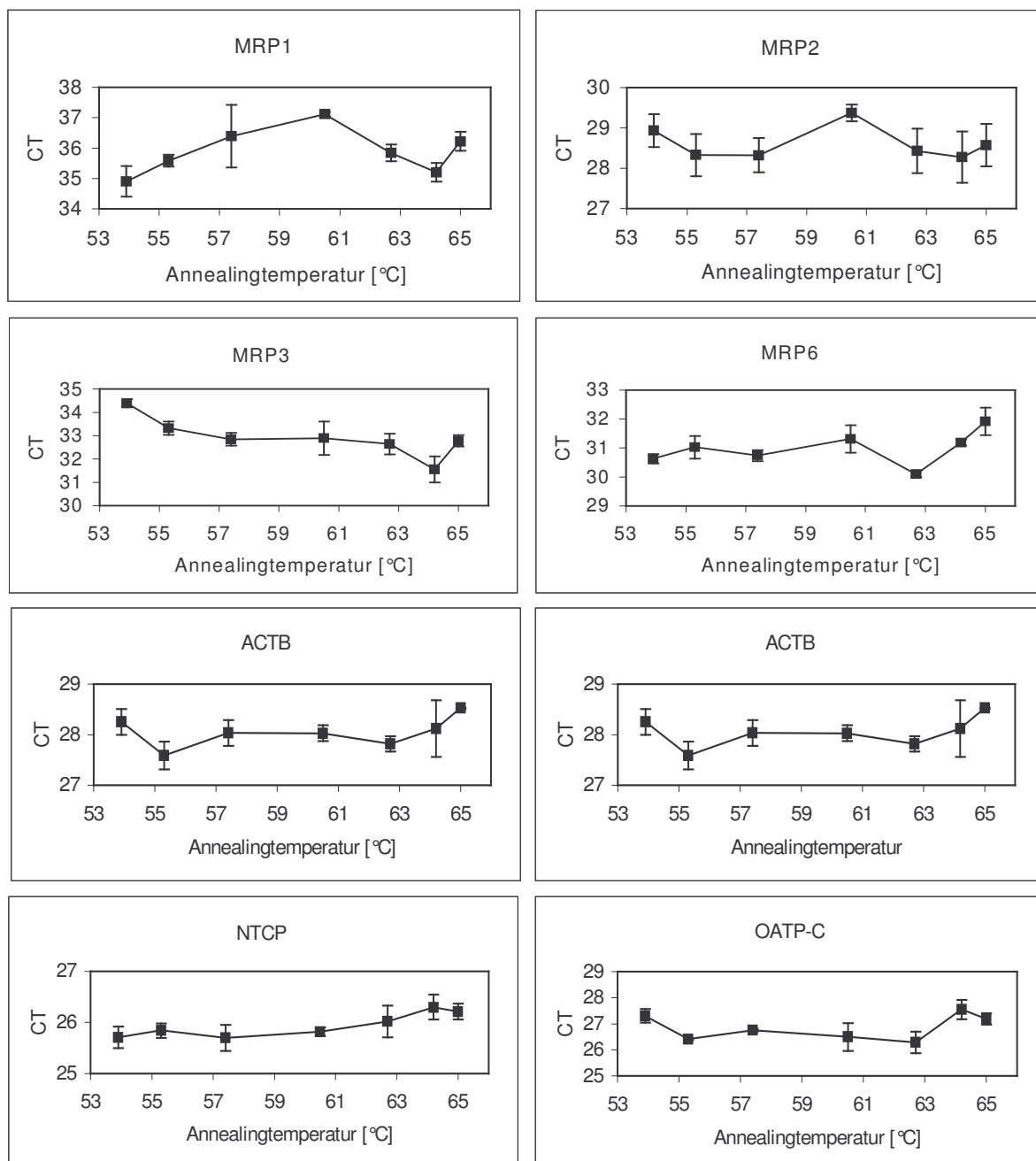


Abb. 3.6: Über den PCR-Block wurde ein Temperaturgradient gelegt (53,9°C bis 65°C) und mit den C_T -Werten verglichen. Alle Werte \pm SD. Für das RTD (Real-time detection)-PCR-Protokoll wurde eine Annealingtemperatur von 55°C gewählt.

Bei der Optimierung der Annealingtemperatur erwies sich 55°C als am besten geeignet (siehe Abb. 3.6). Ein zusätzlicher Temperaturschritt (10 sec 63°C) zwischen Denaturierung und Primerannealing erhöhte die Effizienz der Reaktion für NTCP und OATP-C deutlich.

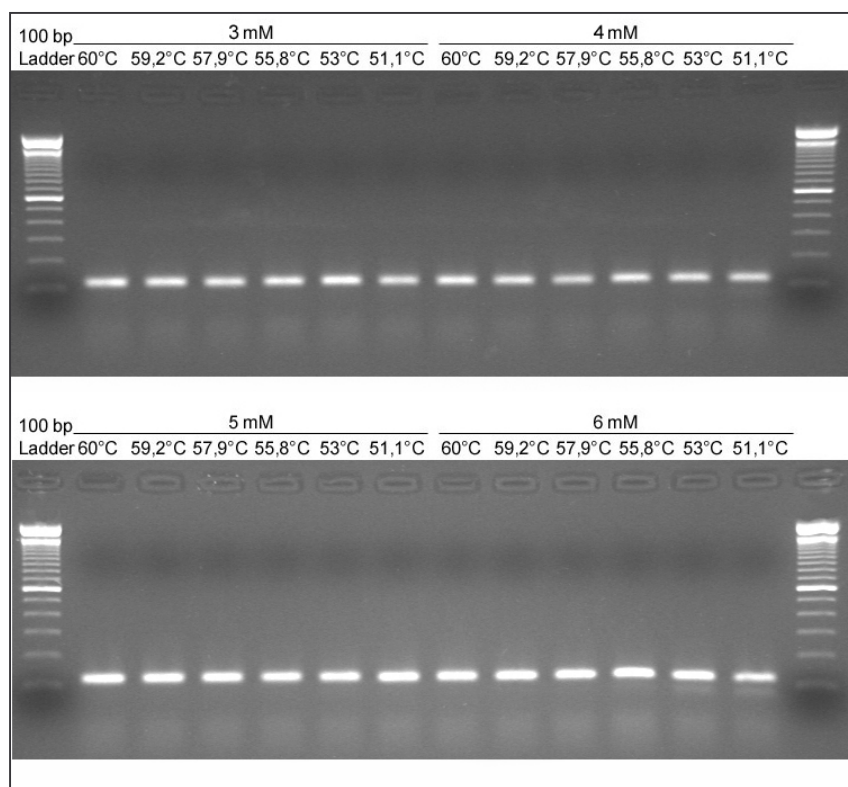


Abb. 3.7: Vier verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen und sechs verschiedene Annealingtemperaturen wurden zur Optimierung der RTD-PCR für NTCP ausgetestet. Es wurden gleiche Mengen PCR-Produkt aufgetragen. Erst bei einer hohen $MgCl_2$ und einer niedrigen Annealing-Temperatur kommt es zur Bildung von Nebenprodukten. Länge des Produktes: 100 bp.

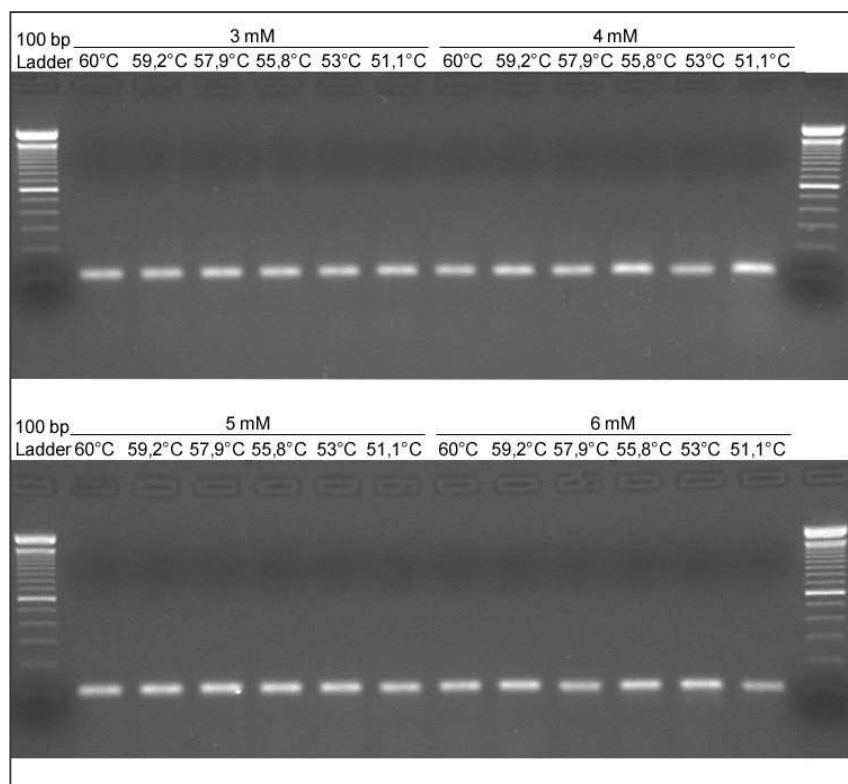


Abb. 3.8: Um die RTD-PCR für BSEP zu optimieren, wurden vier verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen und sechs verschiedene Annealingtemperaturen eingesetzt. Es wurden gleiche Mengen PCR-Produkt aufgetragen. Länge des Produktes: 111 bp.

Eine Veränderung der Primerkonzentrationen oder der MgCl_2 -Konzentrationen war nicht nötig, da nach der Optimierung der Temperatur die eingesetzten Standardkurven von ACTB, BSEP, MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, NTCP und OATP-C eine Effizienz zwischen 90 % und 99 % zeigten. Ausserdem blieben die verwendeten Primer und Sonden über einen breiten MgCl_2 -Konzentrationsbereich (3 mM - 6 mM) und breiten Temperaturbereich (51.1-60°C) spezifisch, wie in Abb. 3.7 und 3.8 zu erkennen ist.

Es hat sich gezeigt, dass eine Sondenkonzentration von 320 nM in allen Reaktionen die besten Resultate erzielt. Eine Veränderung der Sondenkonzentration (100 nM, 500 nM) brachte keine Verbesserungen für den C_T -Wert. Bei 100 nM erreichte die Reaktion das Plateau früher, da die Sonden schneller aufgebraucht waren. Die logarithmische Phase war somit kürzer, der mögliche Messbereich damit kleiner.

Das Volumen des Reaktionsmixes konnte von der ursprünglich verwendeten Menge von 50 μl pro Well (Angaben des Herstellers) auf 28 μl ohne Verluste an Signalintensität oder Spezifität reduziert werden.

Die Verwendung des PCR-Beschleunigers Q-Solution (Qiagen, Hilden) führte zu einer deutlich schlechteren Effizienz und linearen Korrelation. Daher wurde von einem weiteren Einsatz von PCR-Beschleunigern abgesehen.

3.1.5 Reproduzierbarkeit

Ein Vergleich der mit der RTD-PCR bestimmten Kopienzahl und C_T -Wert von unterschiedlichen Proben aus Lebergewebe, sowohl von Patienten mit PSC, als auch von den Kontrollen, für ACTB ist in Abb. 3.9 zu sehen. Eine Regressionsgerade durch die Funktion aus Kopienzahl und C_T -Wert ergibt eine Korrelation von 0.9698. Der Variationskoeffizient für den C_T -Wert beträgt 1.4 %, der der Kopienzahl 19.5 %. Wiederholte Läufe der verschiedenen Standardkurven gaben eine geringe Variationen von 3-4 % in der Steigung (Effizienz) und ca. 4-5 % in dem Schnittpunkt mit der Ordinatenachse.

Obwohl ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals auf einen sequenzspezifischen Zerfall der Sonde schliessen lässt, ist dennoch nicht auszusschliessen, dass es sich hierbei zumindest zum Teil auch um unspezifische Amplifikationsprodukte handelt. Um unspezifische PCR-Produkte zu erfassen, wurden in regelmässigen Abständen die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Es wurden in keiner Reaktion Nebenprodukte (z.B. Primer-Dimere, unspezifische Amplifikationen) beobachtet.

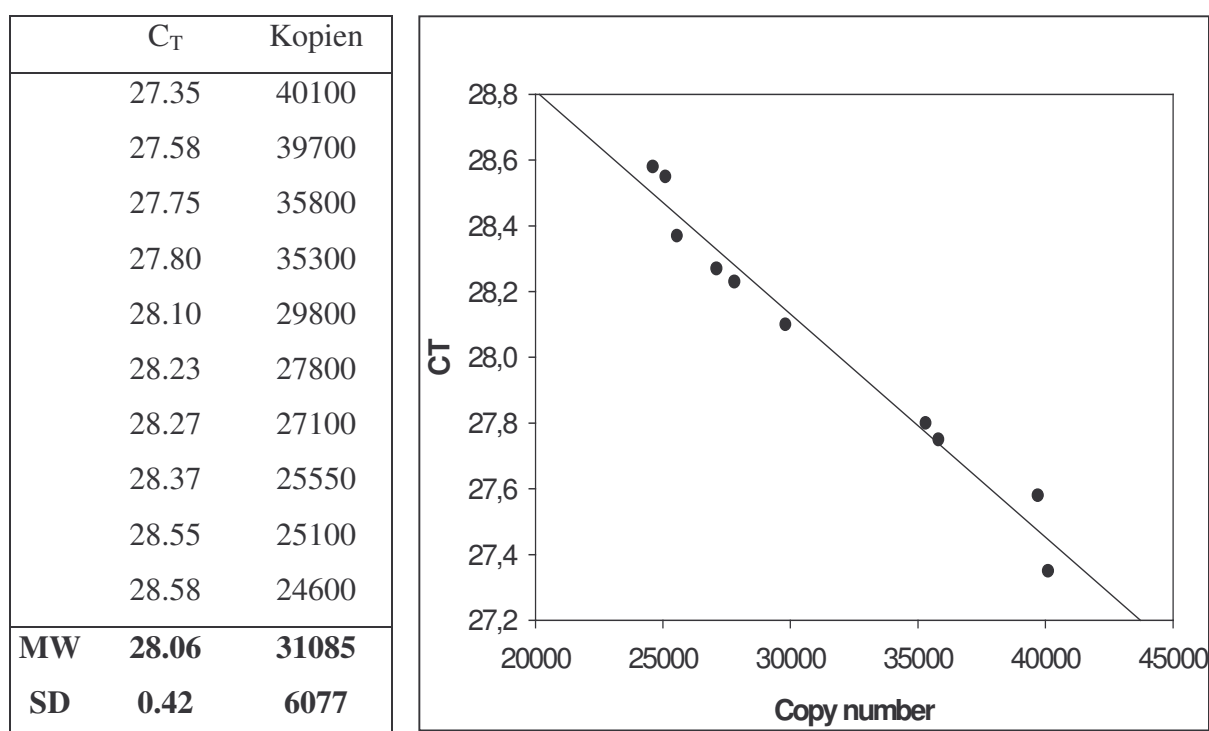


Abb. 3.9: Bestimmung von C_T und Kopienzahl für ACTB in 10 unterschiedlichen Patientenproben ($r^2 = 0.9698$).

3.1.6 Linearität

Eine Quantifizierung wurde, neben der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, auch mit Hilfe von Standardkurven durchgeführt, die aus PCR-Fragmenten hergestellt wurden. Es war keine absolute Quantifizierung, da die errechneten Kopienzahlen letztlich nur relativ zum verwendeten Standard gemessen wurden. Nach den Angaben des Herstellers (Biorad) ist eine lineare Quantifizierung über einen Bereich von 9 log-Stufen möglich. Die in dieser Arbeit verwendeten Standardkurven deckten einen Bereich von 4 log-Stufen ab. Dieser dynamische Bereich von 2×10^3 bis 2×10^6 Kopien zeigte eine lineare Beziehung der Messwerte untereinander. Der Korrelationskoeffizient lag zwischen 0.991 und 1.0 mit einem Mittelwert von 0.996. In Abb. 3.10 (folgende Seite) ist als Beispiel die Standardkurve für ACTB abgebildet.

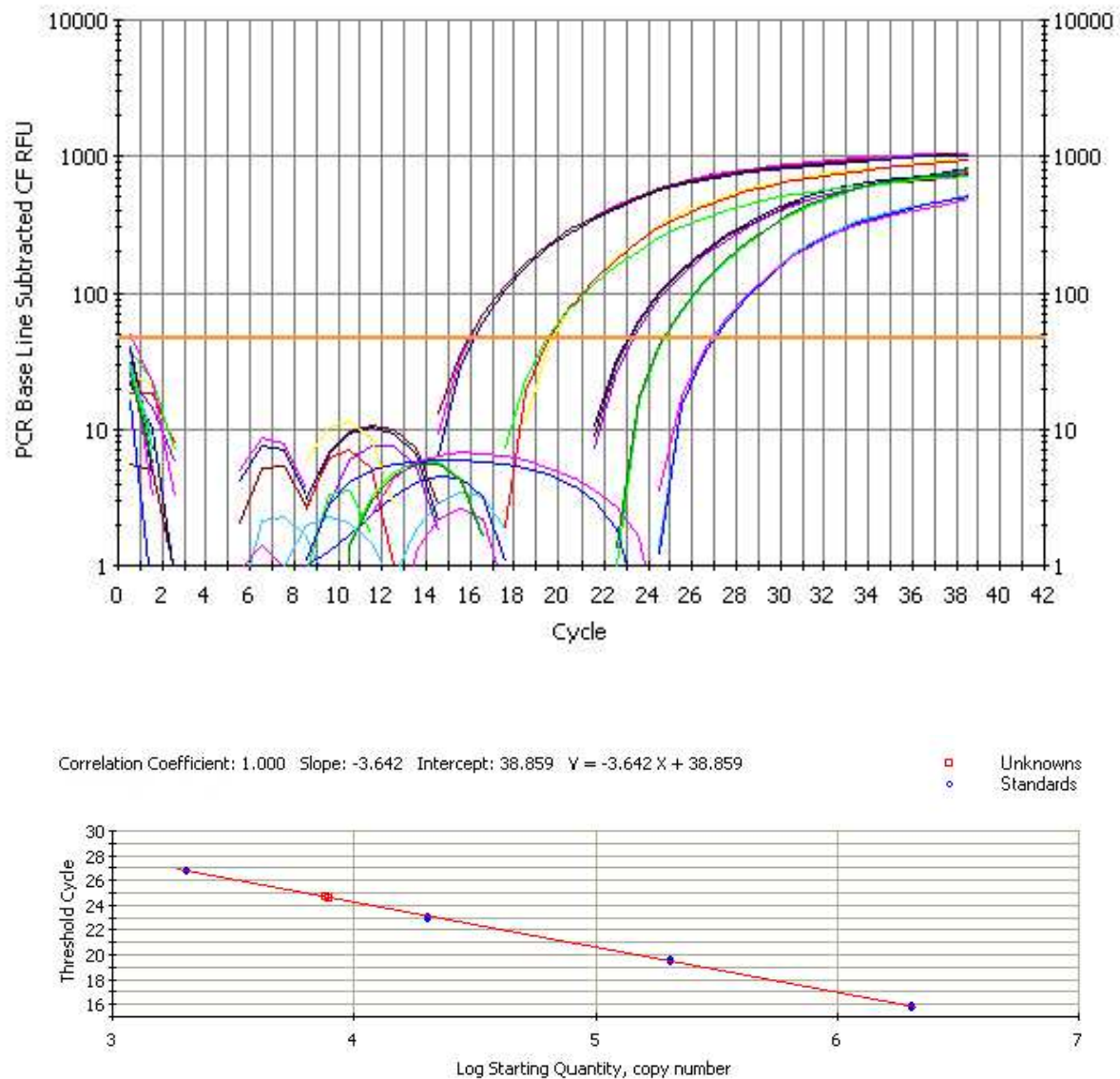


Abb. 3.10: RTD-PCR für ACTB mit einer Standardkurve und einer Patientenprobe. Oben als Funktion von C_T zu relativen Fluoreszenzeinheiten (relativ fluorescence units, RFU), unten als Funktion von C_T zum Logarithmus der eingesetzten Menge (Kopienzahl).

3.2 Expression hepatobiliärer Transporter

3.2.1 mRNA-Expression von MRP3 und OATP-C bei Patienten mit PBC

Die Expressionsstärke der Transporter MRP3 und OATP-C wurde auf mRNA-Ebene bei sechs Patienten mit PBC untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen [n=6; drei Leberteileresektionen bei Lebermetastasen und drei aufgrund einer chronischen Hepatitis C-Virus (HCV)-Zirrhose explantierten Lebern]. Die Kalkulation erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (siehe Material und Methoden, Seite 35). Die Expression von MRP3 im Patientenkollektiv war signifikant niedriger (46 ± 32 %; $p < 0.0005$) als in der Kontrollgruppe (100 ± 15 %) und OATP-C war im Vergleich um 50 ± 42 % ($p < 0.05$) reduziert (Abb. 3.11 und 3.12). OATP-C weist große interindividuelle Unterschiede in der Expressionsstärke auf. MRP3 zeigt eine deutlich niedrigere Variationsbreite.

In Abb. 3.11 sind die ΔC_T -Werte (C_T Target - C_T ACTB) der RTD-PCR aufgetragen. Da $2^{-\Delta\Delta C_T}$ die n-fache Expression widerspiegelt, würde ein Unterschied von +1 (ΔC_T PBC minus ΔC_T Kontrolle) 50 % der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe bedeuten, ein Unterschied von +2 nur 25 % Expression. Bei einem $\Delta\Delta C_T$ von -1 wäre in der PBC-Probe die doppelte Menge an Targetmolekülen vorhanden und bei -2 die vierfache im Vergleich zur Kontrolle.

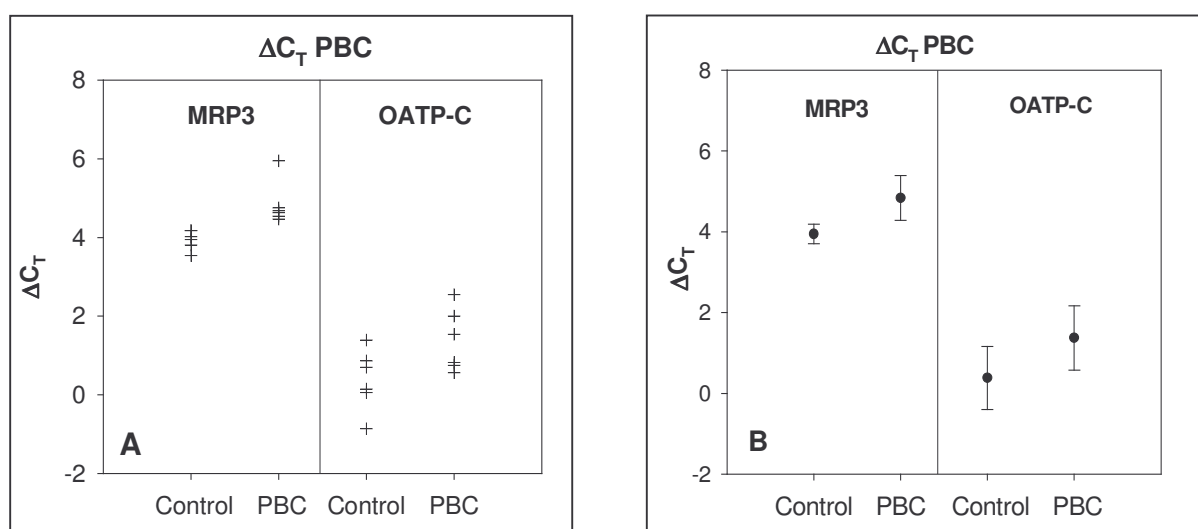


Abb. 3.11: Ein Vergleich der ΔC_T -Werte für MRP3 und OATP-C, jeweils Kontrolle und PBC-Patienten. **A:** Jedes Kreuz repräsentiert den ΔC_T -Wert einer Probe. **B:** Gleiche Darstellung wie A, aber als Mittelwert \pm Standardabweichung.

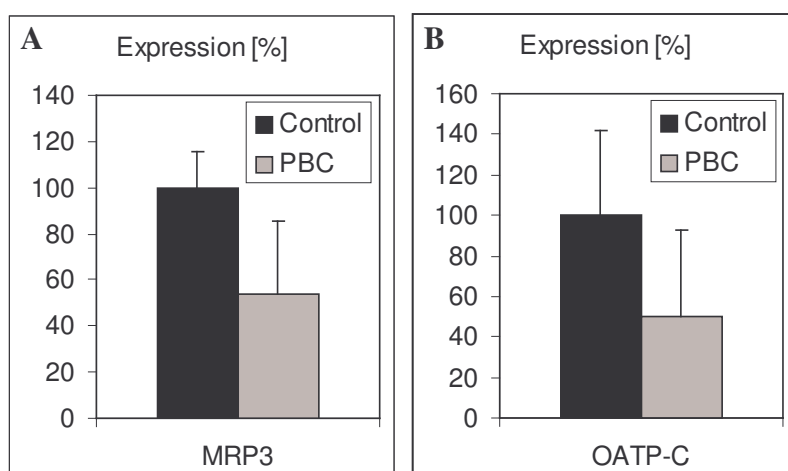


Abb. 3.12: Die mRNA-Expression von MRP3 (A) und OATP-C (B) bei Patienten mit PBC relativ zur Kontrolle. Die Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt

3.2.2 Transporter-Expression bei Patienten mit PSC

Die Expression von MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, BSEP, NTCP und OATP-C wurde auf mRNA-Ebene bei Patienten mit PSC (n=13) mit einer Kontrollgruppe (n=6) verglichen, die aus drei Leberteileresektionen bei Lebermetastasen und drei explantierten Lebern aufgrund HCV-Zirrhose bestand. Die Kalkulation erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode und der Standardkurven-Methode (siehe Material und Methoden, Seite 35).

3.2.2.1 Kalkulation mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Bei der Berechnung der relativen mRNA-Expression mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode konnte ein Unterschied in der Expressionsstärke von OATP-C und BSEP bei PBC-Patientenproben festgestellt werden: OATP-C war relativ zur Kontrolle um 46 ± 43 % signifikant ($p < 0.05$) reduziert, BSEP hingegen auf 259 ± 59 % ($p < 0.005$) hochreguliert (Abb. 3.13 und 3.14).

Die Expression von MRP2 (94 ± 45 %), MRP3 (93 ± 7 %) und NTCP (109 ± 38 %) war im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert, MRP1 (67 ± 47 %) und MRP6 (67 ± 47 %) leicht, jedoch nicht signifikant, erniedrigt. OATP-C und BSEP zeigen eine hohe interindividuelle Schwankung in der Expressionsstärke.

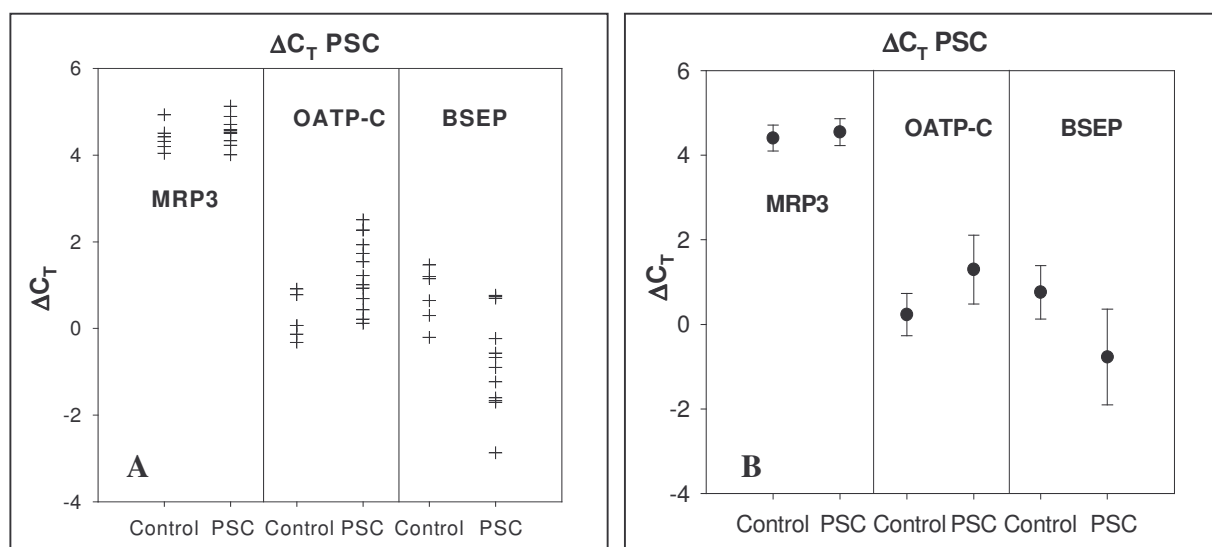


Abb. 3.13: Die ΔC_T -Werte für MRP3, OATP-C und BSEP im Vergleich, jeweils Kontrolle und PSC-Patienten. **A**: Alle ΔC_T -Werte als Scatterplot, in dem jedes Kreuz eine Probe darstellt. **B**: Die ΔC_T -Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

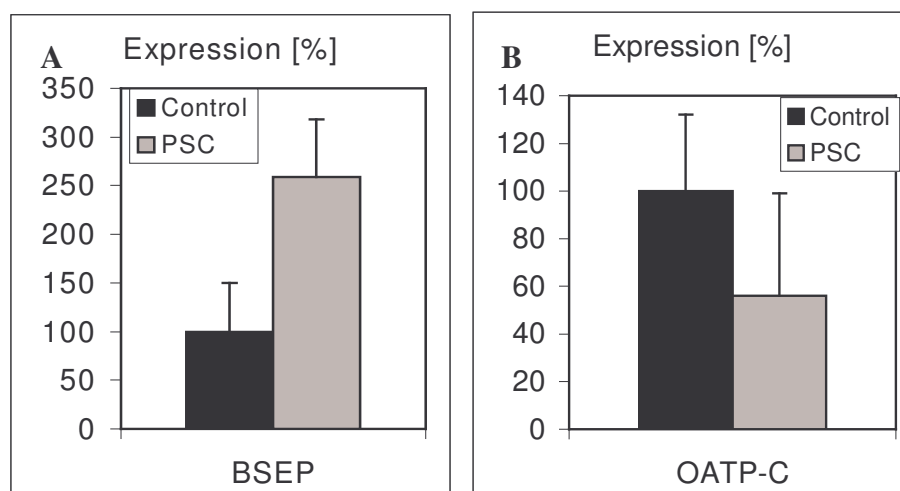


Abb. 3.14: Die mRNA-Expression von BSEP (**A**) und OATP-C (**B**) bei Patienten mit PSC relativ zur Kontrolle. Die Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt

3.2.2.2 Kalkulation nach der Standardkurven-Methode

Wenn die RTD-PCR Daten nach der Standardkurven-Methode (siehe Seite 34) ausgewertet wurden, dann erschien in Patienten mit PSC die mRNA-Expression des basolateral exprimierten Exporters OATP-C im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt (31 ± 4 %; $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu war die Expression von BSEP signifikant auf 249 ± 80 % ($p < 0.05$) erhöht. Die mRNA-Expression von MRP2 und MRP6 sank leicht, aber nicht signifikant auf 82 ± 14 % bzw. 83 ± 17 % der Kontrollen. Alle anderen untersuchten hepatobiliären Transporter [NTCP (102 ± 26 %), MRP1 (109 ± 17 %), MRP3 (90 ± 19 %)] zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.15).

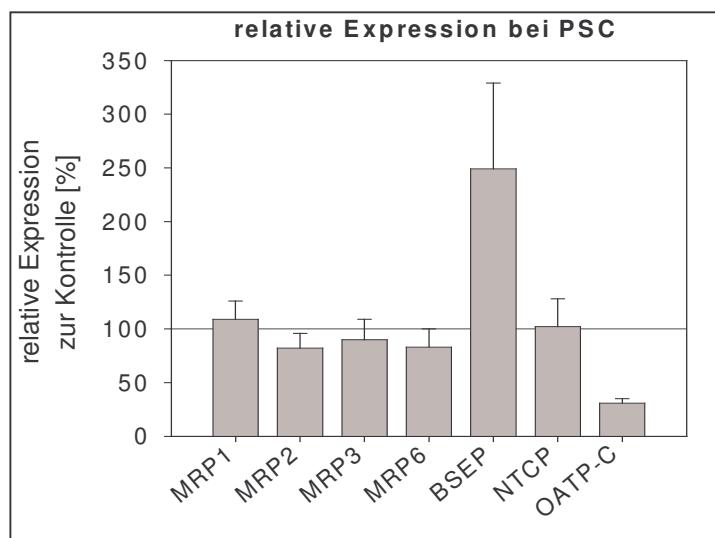


Abb. 3.15: Die mRNA-Expression von MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, BSEP, NTCP und OATP-C in der Leber von Patienten mit PSC, relativ zur Kontrollgruppe. Die Kontrollen (nicht in der Grafik enthalten) wurden auf 100 % gesetzt (horizontale Linie).

BSEP wurde hochreguliert, während OATP-C herunterreguliert war. Alle anderen untersuchten Transporter waren unverändert bzw. nicht signifikant unterschiedlich.

3.2.2.3 Vergleich der Berechnungsmethoden

Wird die $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit der Standardkurven-Methode verglichen, kann festgestellt werden, dass nur geringfügige Unterschiede in den Ergebnissen bestehen (Abb. 3.16). Tendenziell scheint die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ein leicht höheres Ergebnis der relativen Expression als die Standardkurven-Methode zu ergeben. Nur bei MRP1 und MRP6 ist es umgekehrt; bei MRP1 könnte ausserdem von einer verminderten Expression bei PSC-Patienten ausgegangen werden. Diese verschiedenen Aussagen je nach Kalkulationsmethode könnten auf die geringe Targetmenge in den Proben und einer unterschiedlichen Effizienz der PCR-Reaktionen von ACTB und MPR1 zurückgeführt werden.

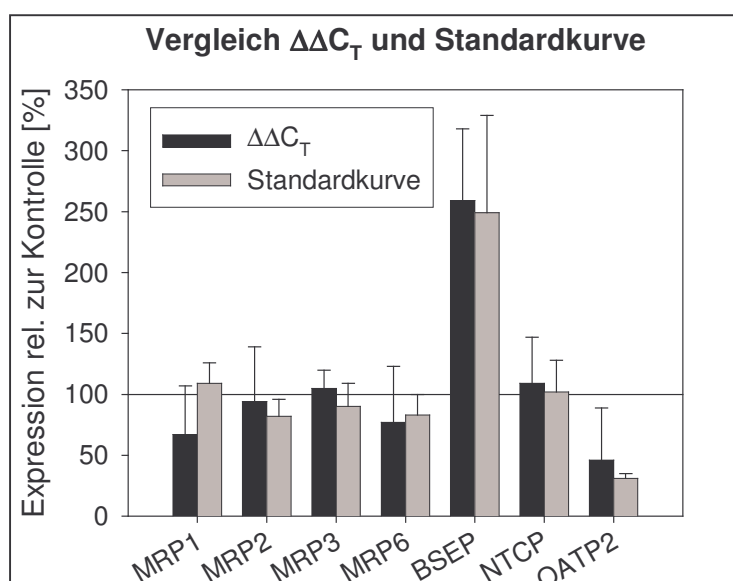


Abb. 3.16: Vergleich der beiden Methoden zur Berechnung der relativen Expression der hepatischen Transporter bei PSC versus Kontrolle. Mit der Ausnahme von MRP1 führen die verschiedenen Berechnungsmethoden nicht zu unterschiedlichen Aussagen.

3.2.3 Transporterregulation durch Parameter der Cholestase

Die Konzentration der cholestatischen Parameter alkalische Phosphatase (AP), Cholinesterase (ChE), Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) und Bilirubin im Blutserum von PBC- und PSC-Patienten wurde mit der n-fachen mRNA-Expression der untersuchten Transporter relativ zur Kontrollgruppe verglichen. Es konnte jedoch für keinen der untersuchten Transporter eine signifikante Korrelation cholestatischer Parameter gefunden werden.

Als Beispiel sind in Abb. 3.17 und 3.18 die Korrelationen der relativen mRNA-Expression von OATP-C bzw. BSEP gegen den Bilirubin-Gehalt des Serums von PSC-Patienten zu sehen.

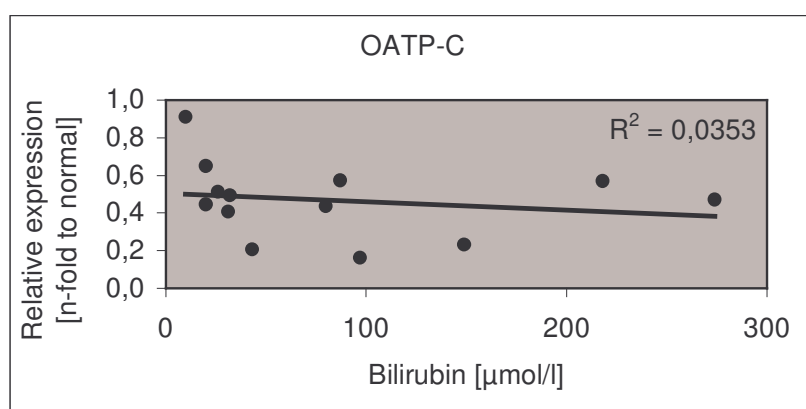


Abb. 3.17: Korrelation der Bilirubin-Konzentration im Blutserum von PSC-Patienten gegen die n-fache Expression von OATP-C mRNA im Lebergewebe.

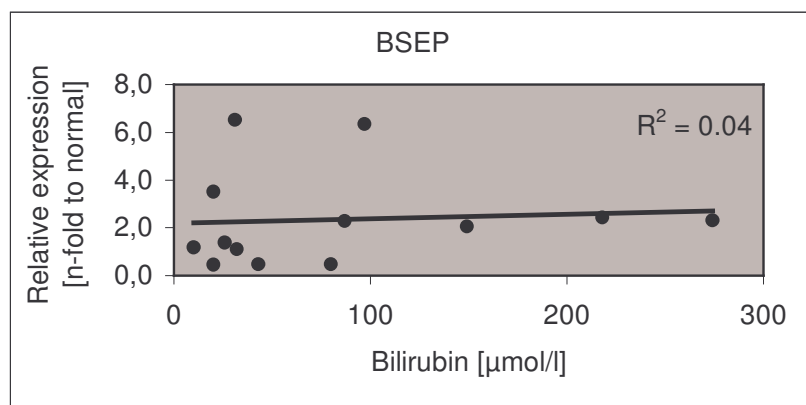


Abb. 3.18: Korrelation der n-fachen Kopienzahl von BSEP mRNA gegen den Serumgehalt von Bilirubin in PSC-Patienten.

3.2.4 Densitometrische Bestimmung von MRP2

Unterschiedliche Mengen Zelllysate von MDCKII-MRP2-Zellen, equivalent 6 bis 27 μg Protein, wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und nach ECL-Belichtung eines Films densitometrisch bestimmt (Abb. 3.19). Die relative optische Dichte des belichteten Films hat eine lineare Beziehung zur eingesetzten Proteinmenge. Ein Vergleich der relativen optischen Dichte und der aufgetragenen Proteinmenge ergab eine Korrelation von $R^2 = 0.988$. Wird die relative optische Dichte in Bahn 1 (27 μg) als 100 % gesetzt und mit den Messungen der anderen Bahnen verglichen, so weichen die dadurch errechneten Prozentzahlen von den theoretischen Werten um $8 \pm 6 \%$ ab.

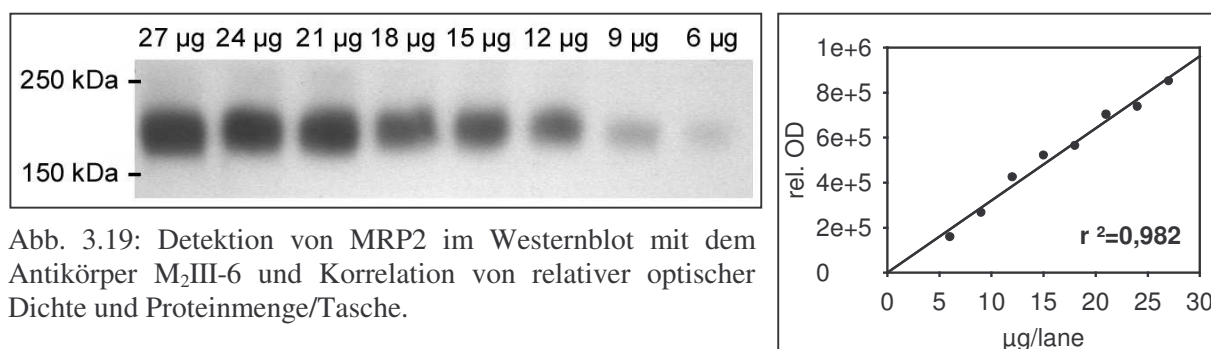


Abb. 3.19: Detektion von MRP2 im Westernblot mit dem Antikörper M₂III-6 und Korrelation von relativer optischer Dichte und Proteinmenge/Tasche.

3.2.5 Regulation auf Proteinebene

MDR3

MDR3 läuft in der SDS-PAGE bei ca. 145 kDa (Abb. 3.20, links). Da ein Defekt der MDR3-Funktion zu schweren Erkrankungen der Gallengänge führt, wurde die Protein-Expression von MDR3 auf Proteinebene in Homogenaten aus PSC-Lebergewebeproben (n=5) untersucht. In allen untersuchten Proben konnte MDR3 nachgewiesen werden (Abb. 3.20 rechts). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen einer Kontrollgruppe (n=3; Leberteilresektionen bei Lebermetastasen) und Patientenproben festgestellt werden.

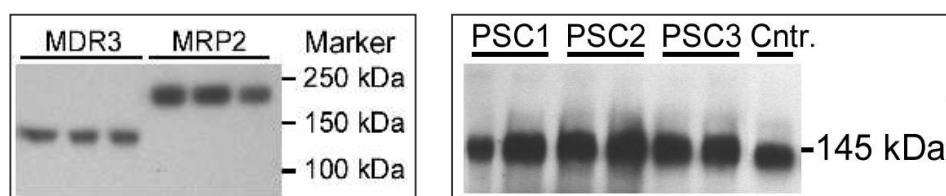


Abb. 3.20: **Links:** Westernblot für MDR3 (145 kDa) und MRP2 (195 kDa). **Rechts** ein Vergleich zwischen drei PSC-Leberhomogenaten und einer Kontrolle. Es wurden jeweils 20 μg Protein/Bahn aufgetragen.

MRP2, BSEP, OATP-C und NTCP

Die Transporter MRP2, BSEP, OATP-C und NTCP wurden in Proben von Patienten mit PSC mit Hilfe des Westernblot untersucht. In der SDS-PAGE läuft MRP2 bei ca. 190 kDa, BSEP bei ca. 175 kDa, OATP-C bei ca. 90 kDa und NTCP bei 59 kDa. Sie sind alle glykosyliert und geben daher im Westernblot eine zweite Bande, die die nicht glykosylierte Form des Proteins darstellt. NTCP hat eine zusätzliche Bande bei ca. 40 kDa und OATP-C bei 58 kDa; bei MRP2 und BSEP taucht die Bande der unglykosylierten Form i.d.R. nur bei Membranpräparationen auf.

Jeweils 20µg Protein, bestimmt nach Bradford, wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. In allen untersuchten Proben (n=10) waren die Transporter MRP2, BSEP, OATP-C und NTCP auf Proteinebene exprimiert und liefen auf der erwarteten Länge. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3; Leberteilresektionen bei Lebermetastasen) war bei PSC-Patienten (n=7) die MRP2-Expression auf 78 % herunterreguliert (nicht signifikant). BSEP war leicht erhöht (117 %, nicht signifikant), OATP-C leicht erniedrigt (90 %, nicht signifikant) und NTCP war unverändert.

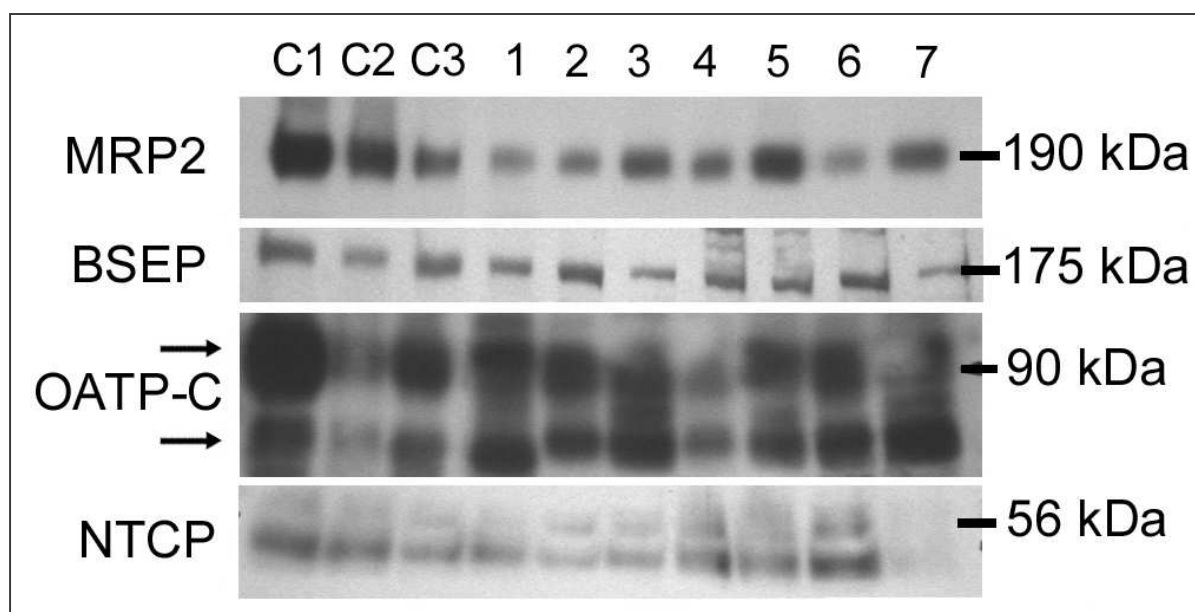


Abb. 3.21: Westernblot von sieben PSC-Leberhomogenaten (1-7) und drei Kontrollen (C1-C3) im Vergleich. MRP2 war auf 78 % herunterreguliert, BSEP um 17 % erhöht und OATP-C leicht erniedrigt. NTCP blieb unverändert.

3.3 Immunhistologische Untersuchungen

3.3.1 Expression und Lokalisation von MRP2

Um die Expression von MRP2 bei Patienten mit PBC und PSC zu untersuchen, wurden vom Lebergewebe Kryoschnitte angefertigt und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

In allen untersuchten Proben (PSC n=12, PBC n=5) konnte MRP2 nachgewiesen werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3; Leberteilresektionen bei Lebermetastase) festgestellt werden. MRP2 ist auch bei PSC in der kanalikulären Domäne exprimiert: Abb. 3.22 (folgende Seite) zeigt eine Doppelfärbung mit MRP2 (grün) und dem basolateral exprimierten Transporter MRP6 (rot). Es war zu erkennen, dass die beiden Proteine sowohl bei PSC (B-D), als auch in der Kontrolle (A), unterschiedliche Domänen im Hepatozyten besetzen. MRP2 kreist die Gallenkapillaren ein (Abb. 3.22 A, Pfeil), MRP6 ist sinusoidal lokalisiert. In der Einzelfärbung (Abb. 3.23) war zu erkennen, dass die Menge von MRP2 (grün) unverändert ist.

Ähnlich stellte es sich bei PBC-Patienten dar: in Abb. 3.24 ist ein Vergleich zwischen Kontrollgewebe (A) und drei verschiedenen PBC-Gewebeschnitten (B-D) zu sehen. MRP2 (grün) erscheint unverändert in Menge und Lokalisation, einzig die Anzahl der Gallengangs-Kapillaren war leicht erhöht. In einer Probe (Abb. 3.24 D) war MRP2 zusätzlich zur kanalikulären Domäne diffus über den Hepatozyten verteilt, was in den anderen PBC-Proben und der Kontrolle nicht beobachtet werden konnte.

In einer von fünf PBC-Proben und in vier von zwölf PSC-Proben konnte eine veränderte Lokalisation unterschiedlichen Ausmaßes beobachtet werden, wie in Abb. 3.25 zu erkennen ist: während sich in der Kontrolle (Abb. 3.25 A) MRP2 (grün) ausschliesslich in der kanalikulären Domäne befindet, kann MRP2 bei PBC zusätzlich diffus im Hepatozyten verteilt vorliegen (B) oder, wie bei drei PSC-Patienten beobachtet, sich in intrazelluläre Vesikel zurückziehen (C und D). Dieser Zustand konnte in einer Probe über weite Areale des Gewebes beobachtet werden (Abb. 3.26), in drei anderen (Abb. 3.25, B-D) war diese Art der Regulation von MRP2 nur lokal zu beobachten. In einer höheren Vergrößerung konnte das Zusammenziehen von MRP2 in Vesikeln um den Zellkern herum beobachtet werden (Abb. 3.26 oben rechts).

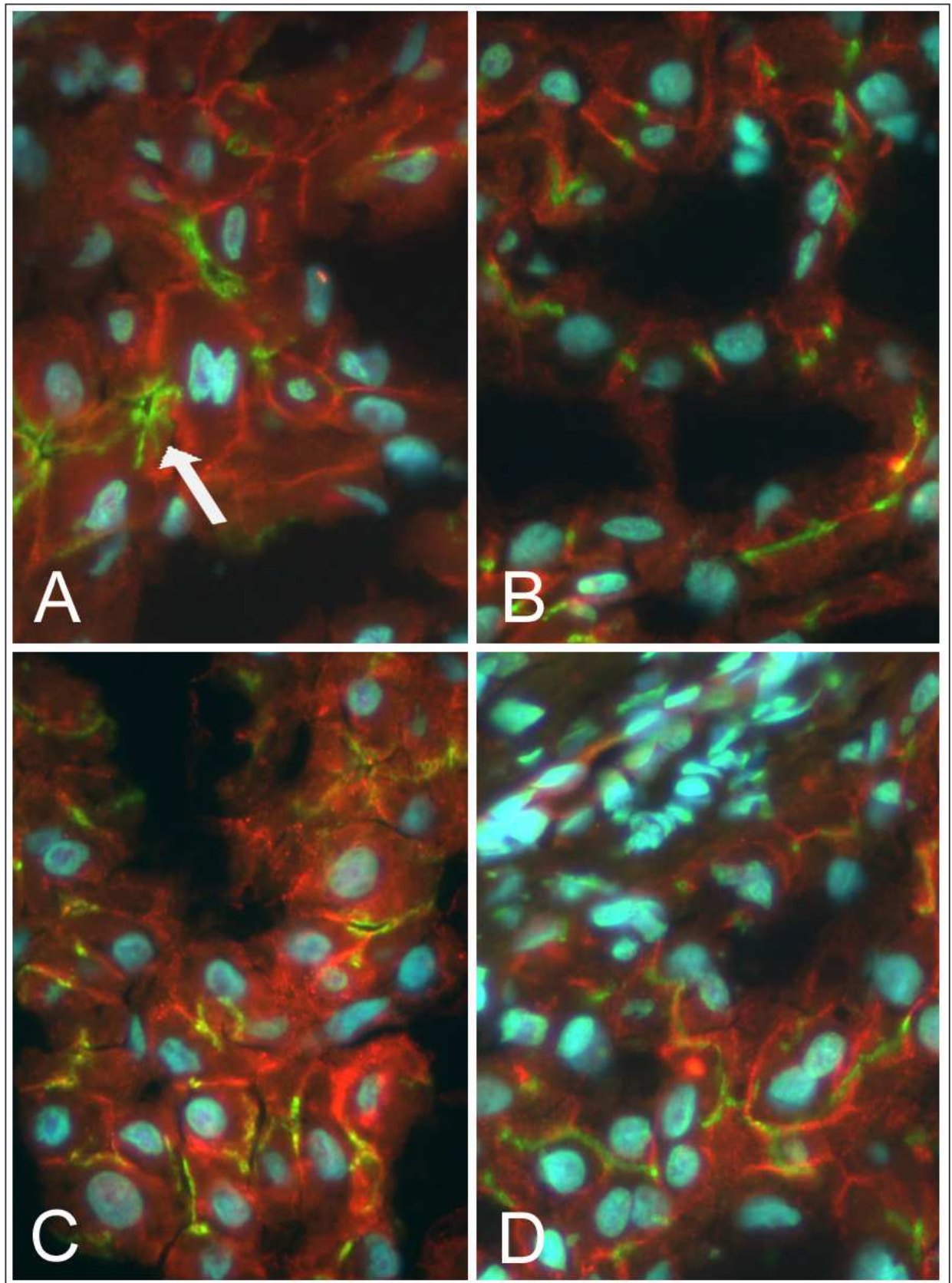


Abb. 3.22: Kryoschnitte aus Lebergewebe von PSC-Patienten. Doppelfärbung mit MRP2 (grün) und dem basolateral exprimierten Transporter MRP6 (rot). In der Kontrolle (A) und bei PSC (B-D) besetzen MRP2 und MRP6 unterschiedliche Domänen im Hepatozyten. MRP2 ist kanalikulär an den Gallenkapillaren lokalisiert (A, Pfeil), MRP6 sinusoidal. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt.

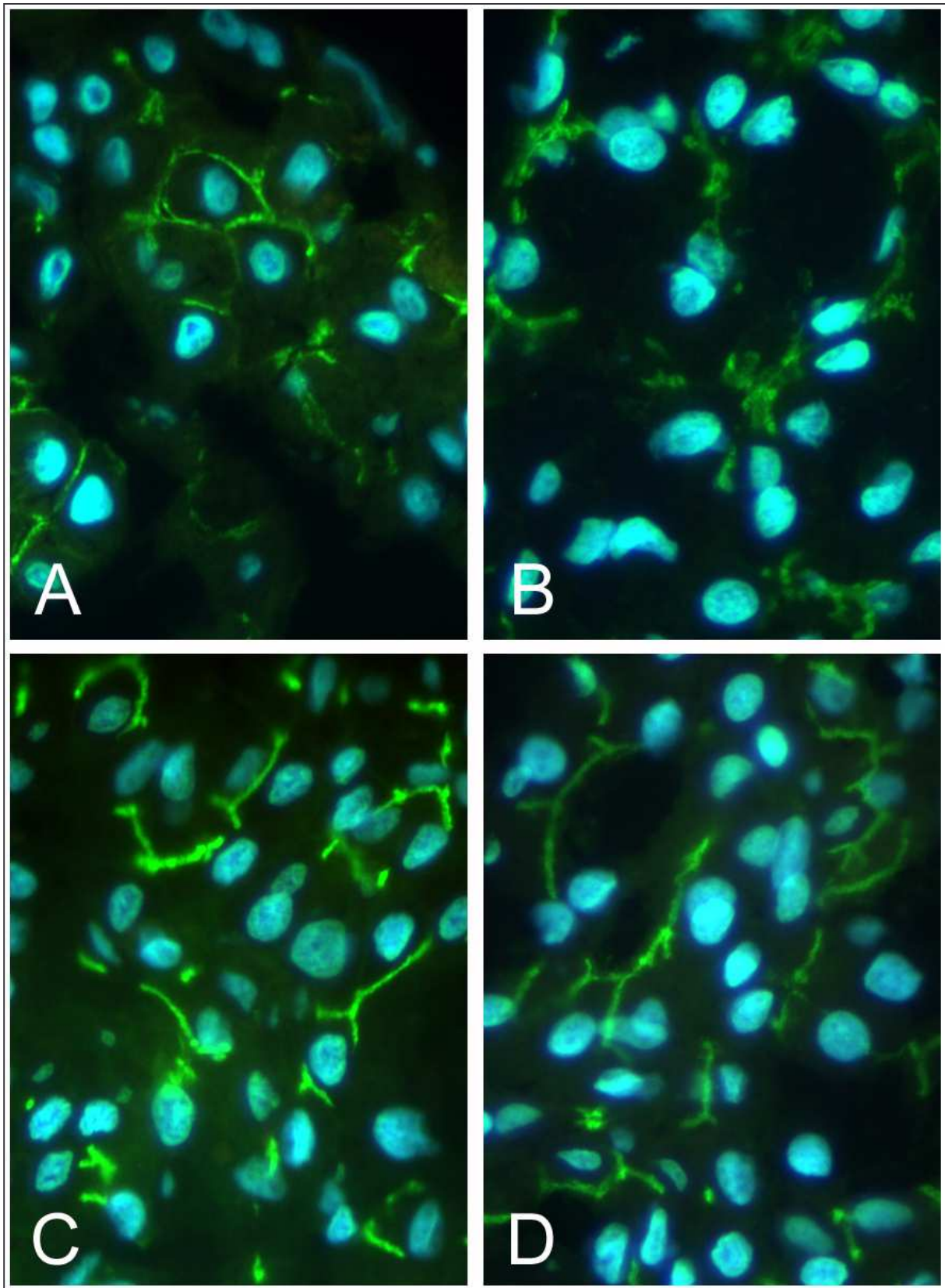


Abb. 3.23: Das Expressionsmuster von MRP2 (grün) ist bei PSC (B-D) im Vergleich zur Kontrolle (A) unverändert, lediglich eine etwas höhere Anzahl an Gallenkapillaren war zu beobachten. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

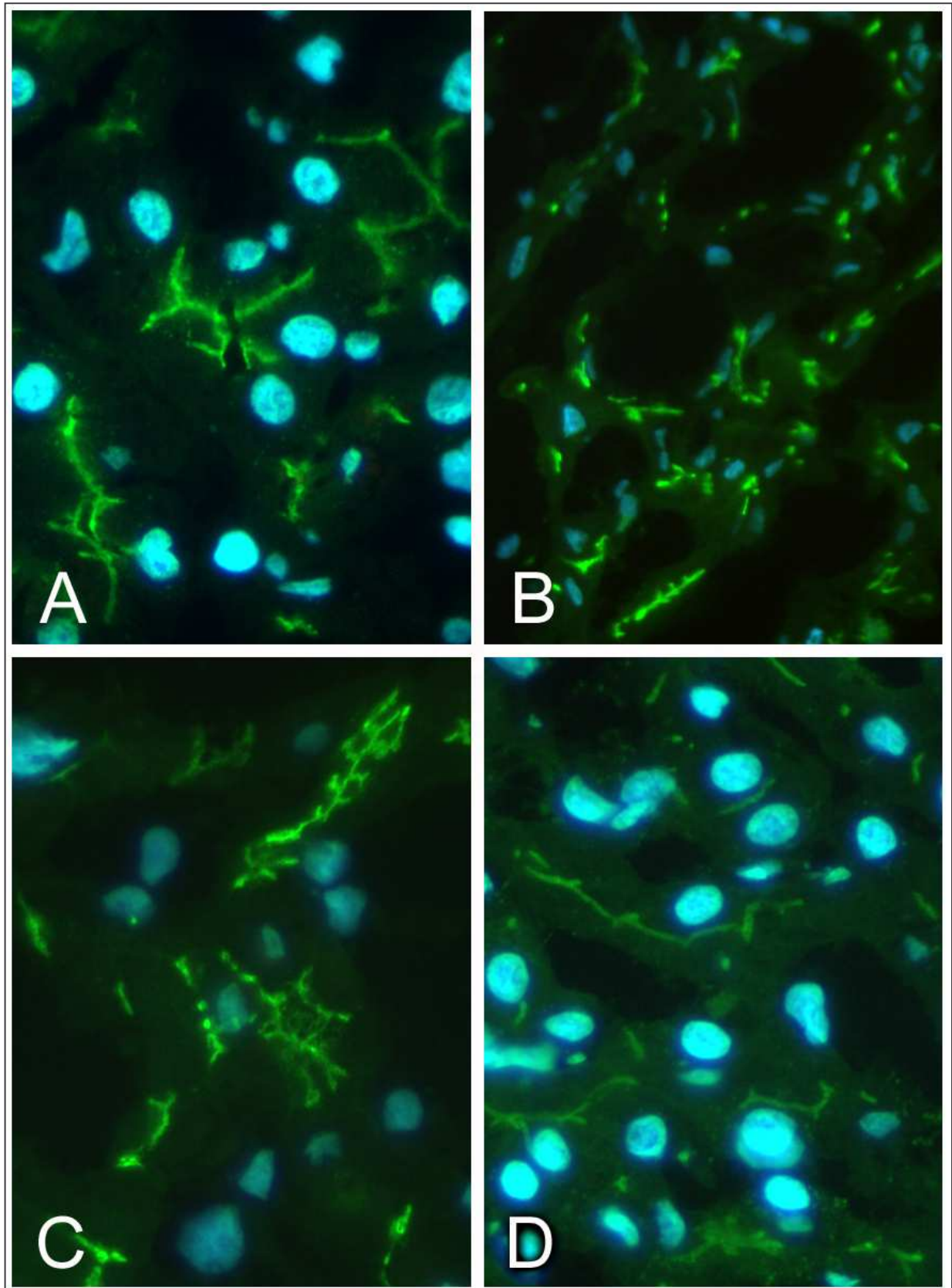


Abb. 3.24: Die Kontrolle (A) unterschied sich nicht im Vergleich zu den PBC-Proben (B-D), lediglich eine leichte Vermehrung der Gallenkapillaren war zu sehen. MRP2 (grün) erscheint unverändert in Menge und Lokalisation. In Bild D ist eine leichte, über den Hepatozyten verteilte Färbung von MRP2 zu sehen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

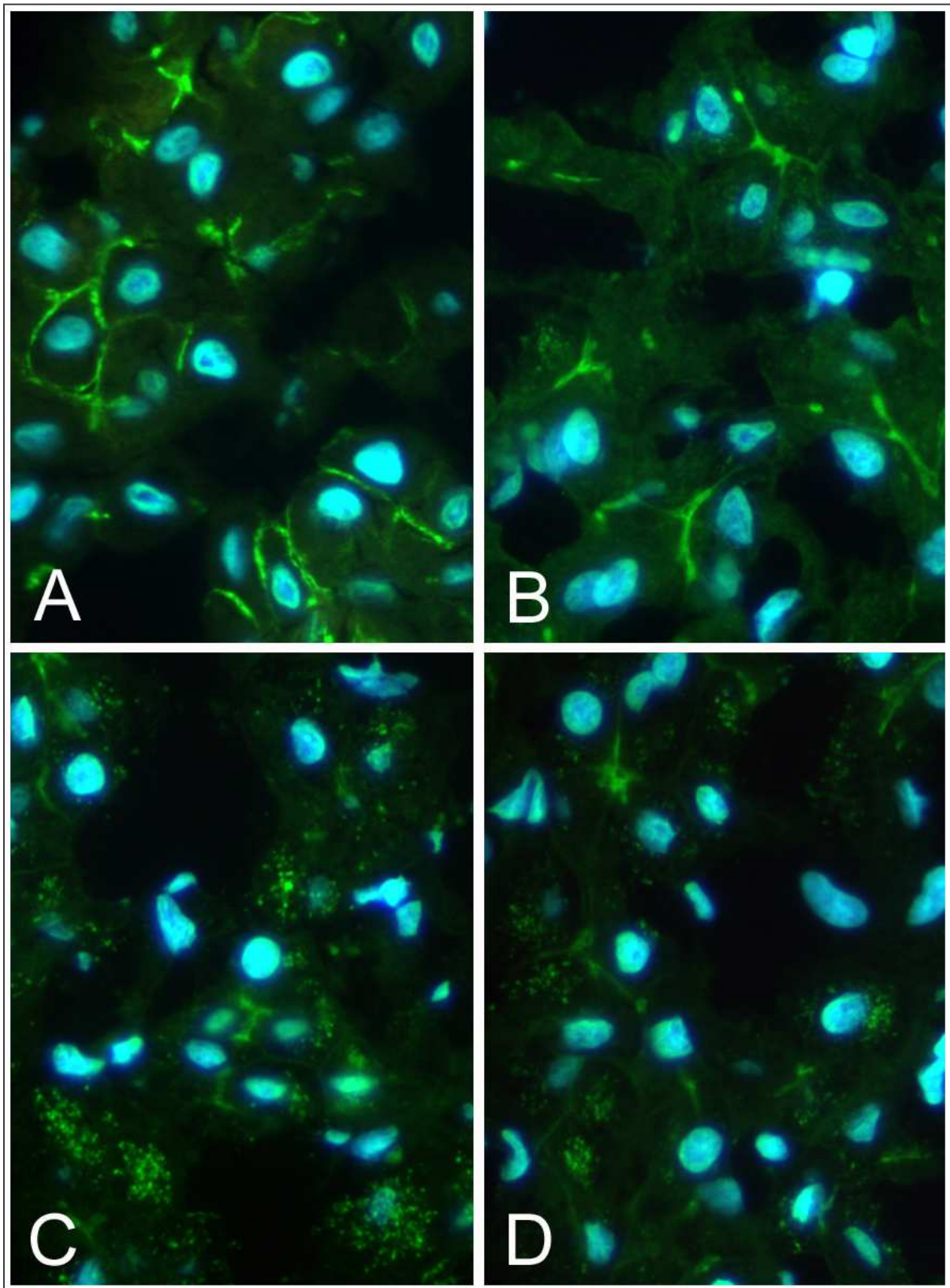


Abb. 3.25: Im Gegensatz zur Kontrolle (A), wo MRP2 (grün) sich ausschliesslich in der kanalikulären Domäne befindet, kann bei PBC und PSC eine zusätzliche Verteilung im Hepatozyten vorliegen. In einer PBC-Probe (B) konnte eine schwache Färbung von MRP2 über den Hepatozyten beobachtet werden, bei PSC fand sich MRP2 in intrazellulären Vesikeln (C und D). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

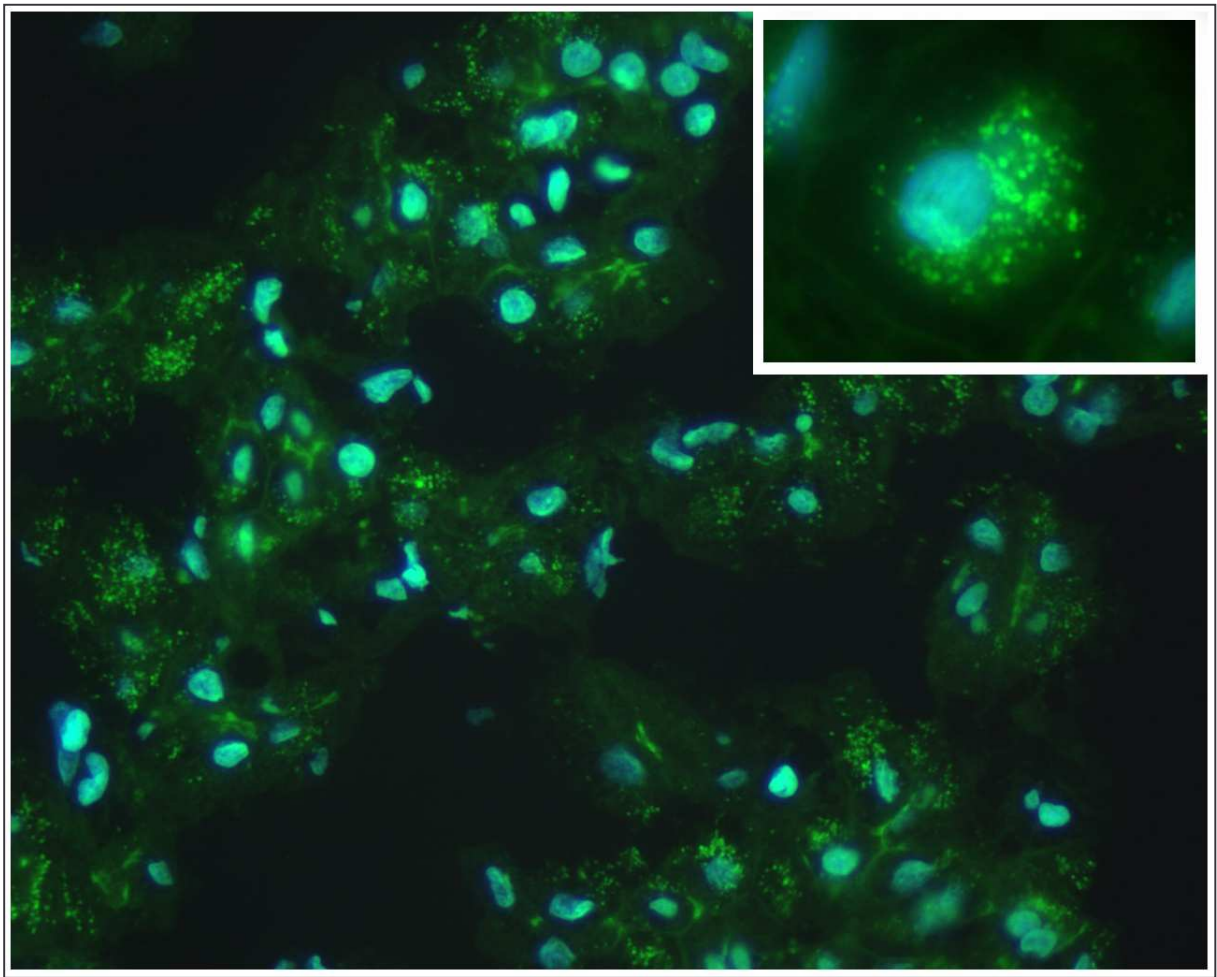


Abb. 3.26: In einer PSC-Probe ist MRP2 (grün) über weite Bereiche des Lebergewebes in intrazellulären Vesikeln konzentriert. Nur ein geringer Anteil befindet sich in der kanalikulären Domäne. In einer höheren Vergrößerung eines Hepatozyten (oben rechts) ist die intrazelluläre Lokalisation um den Zellkern herum (DAPI-Färbung, blau) zu erkennen.

3.3.2 OATP-C und NTCP

Kryoschnitte aus Lebergewebe von 12 PSC-Patienten und 5 PBC-Patienten wurden auf Expression und Lokalisation von OATP-C und NTCP hin untersucht. Als Beispiel zeigt Abb. 3.27 eine Doppelfärbung von OATP-C (rot) zusammen mit MRP2 (grün) in einer PSC-Leber, Abb. 3.28 zeigt NTCP (rot) zusammen mit MRP2 (grün) für PBC und PSC. In allen untersuchten Proben konnte OATP-C und NTCP nachgewiesen werden. In der Immunfluoreszenzfärbung konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3; Leberteilresektionen bei Lebermetastasen) festgestellt werden. OATP-C und NTCP waren membranständig in ihrer sinusoidalen Domäne lokalisiert, MRP2 in der kanalikulären Domäne. Weder in PBC- noch in PSC-Lebergewebe konnte ein signifikanter Unterschied in Lokalisation oder Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

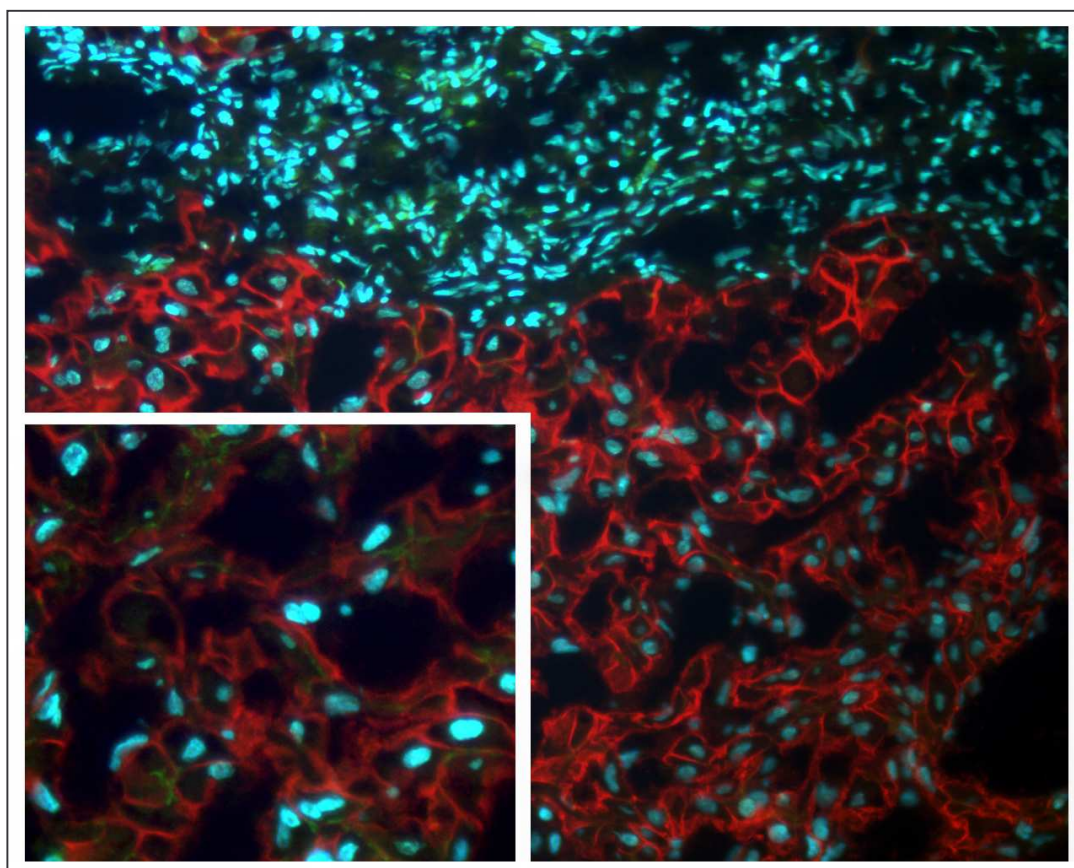


Abb. 3.27: Leberprobe eines PSC-Patienten. OATP-C (rot) ist in der sinusoidalen Membran lokalisiert, MRP2 (grün) in der kanalikulären. Im oberen Teil des Bildes ist fibrotisches Gewebe zu erkennen, in dessen Nähe die Expression von OATP-C unverändert ist. Im Vergleich zur Kontrolle (nicht gezeigt) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

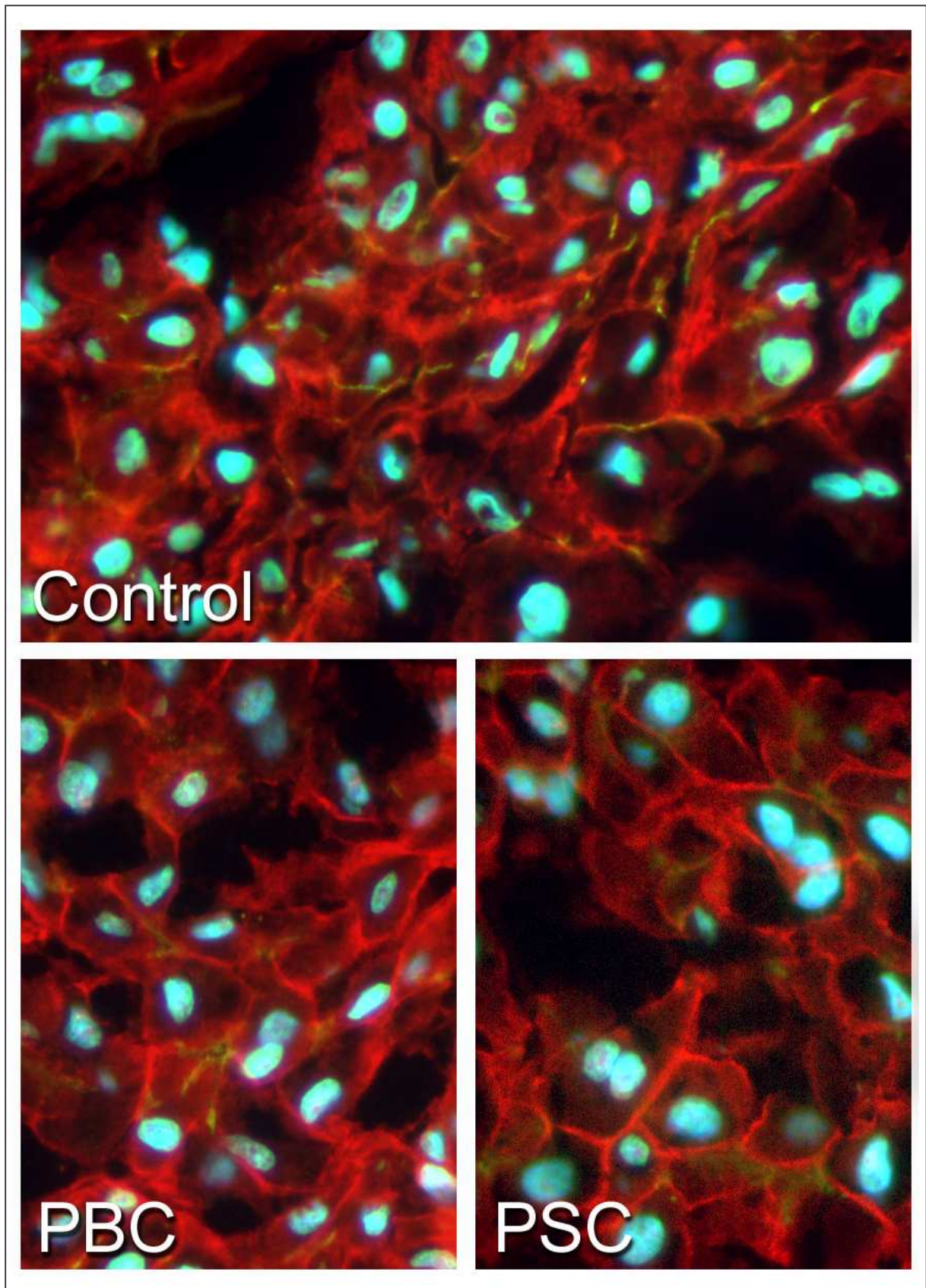


Abb. 3.28: NTCP (rot) und MRP2 (grün) bei unterschiedlichen Gewebeschnitten: Im Vergleich zur Kontrolle (oben), konnte bei PBC und PSC (unten) kein Unterschied in Lokalisation und Expressionsstärke festgestellt werden.

3.3.3 Expressionsmuster hepatobiliärer Transporter bei PSC-Patienten

Als Zusammenfassung der Ergebnisse aus RTD-PCR und Westernblot sind in Abb. 3.29 auf der linken Seite die Unterschiede in der mRNA-Expression und auf der rechten Seite die Expression auf Proteinebene in der Leber von Patienten mit PSC im Vergleich zur Kontrolle veranschaulicht.

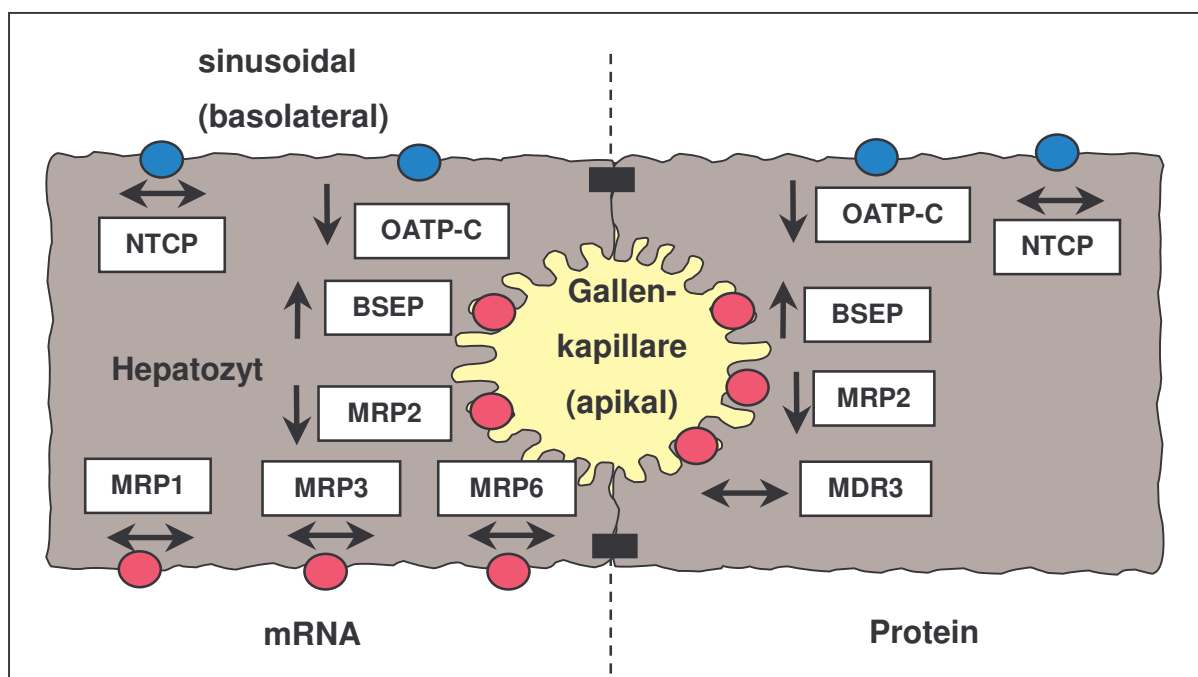


Abb. 3.29: Expression der hepatobiliären Transporter im Lebergewebe von PSC-Patienten. Auf mRNA-Ebene (links) waren die sinusoidal exprimierten Transporter MRP1, MRP3, MRP6 und NTCP unverändert, während OATP-C herunterreguliert war. Von den kanalikulären Transportern war MRP2 herunterreguliert und BSEP hochreguliert. Auf Proteinebene (rechts) war OATP-C etwas niedriger exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ebenso wie MRP2. MDR3 und NTCP blieben unverändert. BSEP war in Patienten mit PSC auf Proteinebene hochreguliert.

3.3.4 Veränderung der Transporterexpression durch Sirolimus

Die mRNA-Expression der Transporter MRP2, MRP3, MRP6 und NTCP wurde in HepG2-Zellen unter Einfluss von Sirolimus (SRL) untersucht. Die Zellen wurden mit 5 μ M SRL inkubiert und die RNA nach 6 h, 12 h und 26 h extrahiert. Für jeden Zeitpunkt wurden je drei behandelte und drei unbehandelte Proben gewonnen. Für die RTD-PCR wurde cDNA äquivalent 150 ng RNA pro 28 μ l Reaktionsmix (ACTB: 15 ng pro 28 μ l) eingesetzt. Die Berechnungen wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ - und der Standardkurven-Methode durchgeführt.

Um auszuschliessen, dass das als interner Standard dienende Gen ACTB durch SRL herauf- oder herunterreguliert wird, wurden die C_T -Werte und die nach der Standardkurve errechneten Kopienzahlen von ACTB aus 12 Proben, abgenommen nach 26 h, miteinander verglichen (Tab. 3.3). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Daher wird davon ausgegangen, dass ACTB zur Normalisierung geeignet ist, da es sich durch die experimentelle Manipulation nicht zu verändern scheint.

Kontrolle			5 μ M Sirolimus	
	C_T	Kopien	C_T	Kopien
	21,27	32400	20,63	49000
	21,71	24400	20,82	43400
	21,81	22900	21,08	36700
	21,24	33100	20,57	51000
	21,21	33700	20,74	45700
	20,96	39800	20,59	36500
	21,11	36000	21,08	35100
	21,23	33200	21,19	34300
	21,46	28800	21,88	21900
	20,39	57300	22,05	19600
	21,23	33200	22,24	17300
	20,96	39600	22,5	14700
MW	21,22	34533	21,28	33767
SD	0,37	8820	0,70	12644

Tab. 3.3: Vergleich der ACTB-Expression. C_T -Werte bzw. Kopienzahl nach 24 Stunden Inkubation mit bzw. ohne Sirolimus (SRL).

Nach Gabe von 5 μ M SRL war die mRNA-Konzentration von MRP2 unabhängig von der Kalkulationsmethode bei allen Messpunkten signifikant auf das 1.16 bis 1.59-fache erhöht (Tab. 3.4). Die Expression von MRP6 blieb nach 12 Stunden unverändert, aber nach 26 h stieg die Expression um das 1.2 bzw. 1.7-fache an. Wurde die mRNA von NTCP nach der Standardkurven-Methode berechnet, blieb die Menge unverändert. Wird die Expression relativ zur Kontrolle mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet, scheint NTCP nicht signifikant bei 6 und 12 Stunden auf 74 % erniedrigt zu sein.

n-fache Expression						
	MRP2		MRP6		NTCP	
	$\Delta\Delta C_T$	STK	$\Delta\Delta C_T$	STK	$\Delta\Delta C_T$	STK
6h	1,18	1,37*	1,03	1,01	0,73	1,02
12h	1,59**	1,44***	0,82	1,15	0,74	1,05
26h	1,16	1,16	1,20	1,68*	1,15	1,12

Tabelle 3.4: Die n-fache Expression von MRP2, MRP6 und NTCP nach 6 h, 12 h und 26 h Inkubation von HepG2 Zellen mit Sirolimus. Die Berechnung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ - und der Standardkurven-Methode. STK = Standardkurve. *) $p < 0.05$; **) $p < 0.01$; ***) $p < 0.005$.

3.3.5 Regulation von MRP3 durch Sirolimus

Auf HepG2-Zellen wurde Medium mit bzw. ohne 5 μ M SRL gegeben (n=3) und die extrahierte RNA gepoolt. Die C_T -Werte und Kopienzahl von MRP3 und ACTB wurde bestimmt (n=3). Die Berechnung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode und der Standardkurven-Methode.

Während die Expression von MRP2, MRP6 und NTCP relativ schwach durch SRL verändert wurde, kam es bei MRP3 zu einer starken Induktion (Tab. 3.5; Abb. 3.30): nach 12 Stunden war die Targetmenge bereits 2.3 mal höher im Vergleich zur Kontrolle. Nach 21 und 24 Stunden war die Expression auf das vierfache erhöht ($p < 0.005$). Nach 48 Stunden ging die mRNA-Konzentration auf 74 % zurück.

Induktion von MRP3 durch SRL		
	$\Delta\Delta C_T$	Standardkurve
6 h	1,26	1,32
12 h	2,32*	2,20**
21h	4,29***	4,11*
24h	3,97***	3,97*
48h	0,73	0,76

Tab. 3.5: Die Expression von MRP3 in mit Sirolimus behandelten HepG2-Zellen, dargestellt als n-fache Kopienzahl im Vergleich zur Kontrolle. Die Wahl der Berechnungsmethode hat nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis.

*) $p < 0.05$; **) $p < 0.01$; ***) $p < 0.005$.

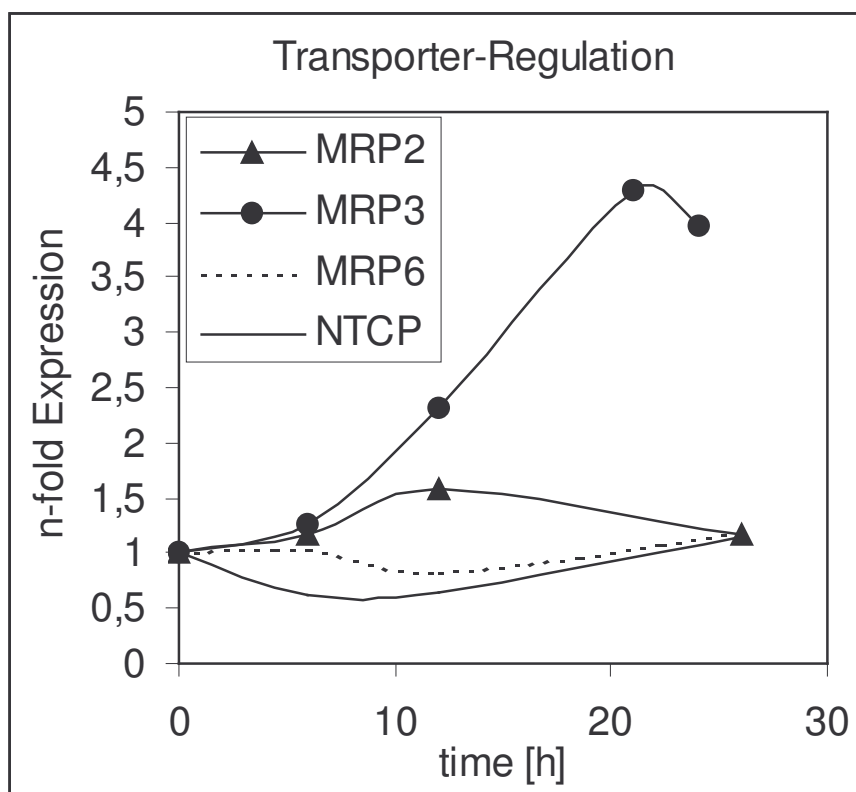


Abb. 3.30: Regulation von MRP2, MRP3, MRP6 und NTCP in HepG2-Zellen nach Inkubation mit 5 μ M Sirolimus. Die Berechnung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. NTCP und MRP6 scheinen herunterreguliert zu werden, MRP2 und MRP3 hochreguliert.

3.4 Transport durch Monolayer im Transwell-System

3.4.1 Funktion und Integrität der Monolayer

3.4.1.1 Transporterexpression in Caco-2 Zellen

Viele Studien zum Transport von Medikamenten werden mit Hilfe von Caco-2 Zellen durchgeführt. Für ein Verständnis der Rolle der hepatobiliären Transporter ist es sinnvoll, die Expression dieser in den Caco-2 Zellen zu kennen.

In der RT-PCR liessen sich MDR1, MRP1 bis MRP6 und NTCP nachweisen (Abb. 3.31). Im Westernblot konnte MRP1 und MRP2 nachgewiesen werden (alle anderen Transporter wurden im Westernblot nicht untersucht; Abb. 3.32).

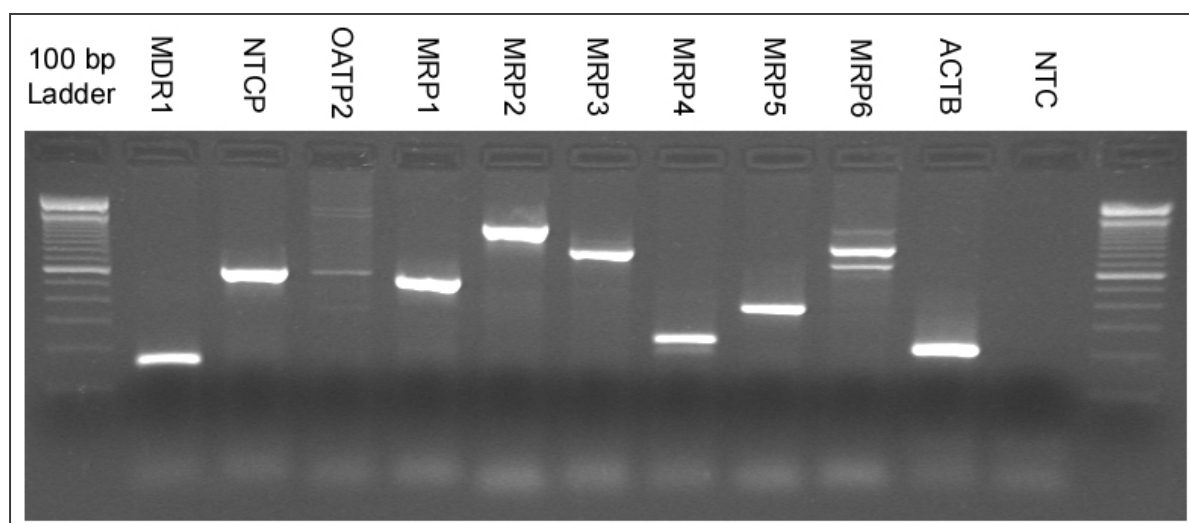


Abb. 3.31: Eine RT-PCR mit gRNA aus Caco-2 Zellen. Länge der Produkte: MDR1 157 bp, NTCP 594 bp, OATP2 594 bp, MRP1 525 bp, MRP2 1254 bp, MRP3 828 bp, MRP4 244 bp, MRP5 381 bp, MRP6 888 bp, ACTB 202 bp. NTC = non-Template Control

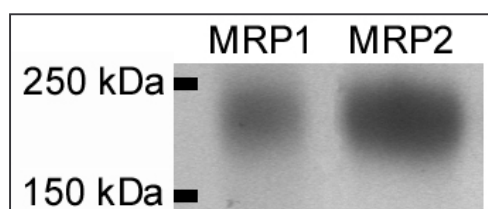


Abb. 3.32: in 2×10^4 Caco-2 Zellen pro Well konnte MRP1 und MRP2 mit dem Antikörper MRPr1 bzw. M₂III-6 detektiert werden.

3.4.1.2 Transporterexpression in stabil transfizierten MDCKII-Zellen

MRP1, MRP2, MRP3 und MDR1 überexprimierende MDCKII-Zellen (MDCKII-MRP1, MDCKII-MRP2, MDCKII-MRP3 und MDCKII-MDR1) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. P. Borst vom Netherlands Cancer Institute (NKI) zur Verfügung gestellt.

Die Funktionalität der Zellen wurde kontrolliert; dabei wurde die genomische DNA und die mRNA der Zellkulturen mittels PCR und RT-PCR und die Proteinexpression im Westernblot (Abb. 3.33, 3.34 und 3.35) und histologisch (Abb. 3.37) untersucht. Alle untersuchten transfizierten Zellkulturen zeigten keine Mängel: in der genomischen DNA und der mRNA liessen sich die entsprechenden Sequenzen nachweisen. Im Westernblot und der Immunfärbung konnte die Expression auf der Proteinebene nachgewiesen werden.

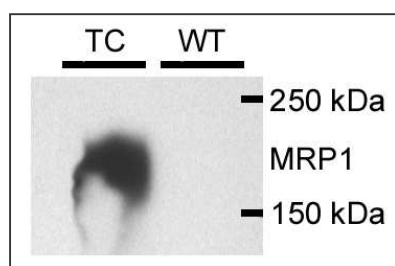


Abb. 3.33: Im Westernblot war bei den überexprimierenden Zellen eine starke Bande bei ca. 190 kDa zu sehen, die MRP1 entspricht. (WT = Wildtyp, TC = transfizierte Zellen)

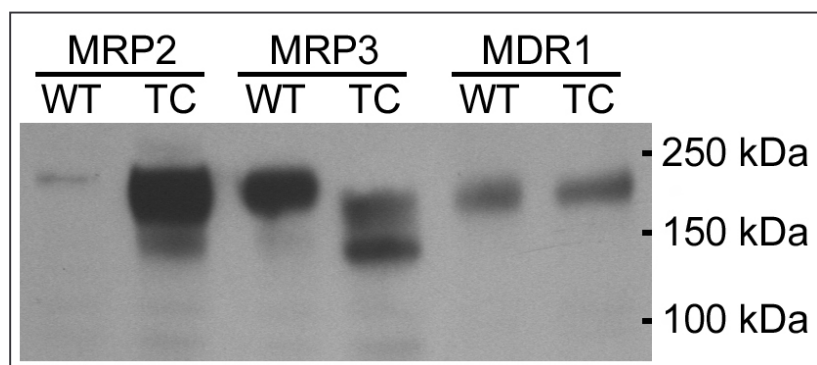


Abb. 3.34: MDCKII-Zellen, die das humane MRP2, MRP3 bzw. MDR1 überexprimieren (TC), im Vergleich zum Wildtyp (WT). Der WT zeigte, wie in der RT-PCR, eine schwache Expression von MRP2. In den WT-Zellen erkannte der Antikörper ein Protein, dass eventuell das canine Homolog des MRP3 darstellt. MDR1 wird sowohl im

WT, als auch in den TC exprimiert. Die Detektion von MDR1 erfolgte mit dem Antikörper C494.

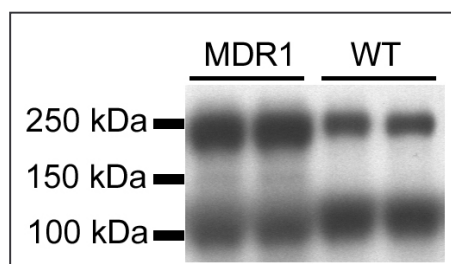


Abb. 3.35: Färbung von MDR1 in MDCKII-WT und MDCKII-MDR1 Zellen mit dem Antikörper C219. Die untere Bande bei ca. 110 kDa ist das unglykosylierte Protein, die Bande bei ca. 240 kDa das glykosylierte MDR1-Protein. Auch in den Wildtyp-Zellen war ein Signal für MDR1 vorhanden, wenn auch nicht so intensiv wie bei den überexprimierenden Zellen. (WT = Wildtyp, MDR1 = überexprimierende Zellen)

In Kryoschnitten von auf Transwell-Membranen gewachsenen Zellen konnte gezeigt werden, dass MRP2 in der apikalen Domäne der Zellen exprimiert wird (Abb. 3.36). Ausserdem war für alle transfizierten MDCKII-Zelllinien und den WT zu sehen, dass die Zellen als Monolayer wuchsen und nicht durch die Poren der Membran hindurch gewachsen waren, daher ist eine Porengröße von 3 μm geeignet. Caco-2 hingegen wuchsen durch die 3 μm Poren hindurch und hatten die andere Seite der Transwell-Membran besiedelt. Für Caco-2 Zellen sollten daher kleinere Porendurchmesser verwendet werden.

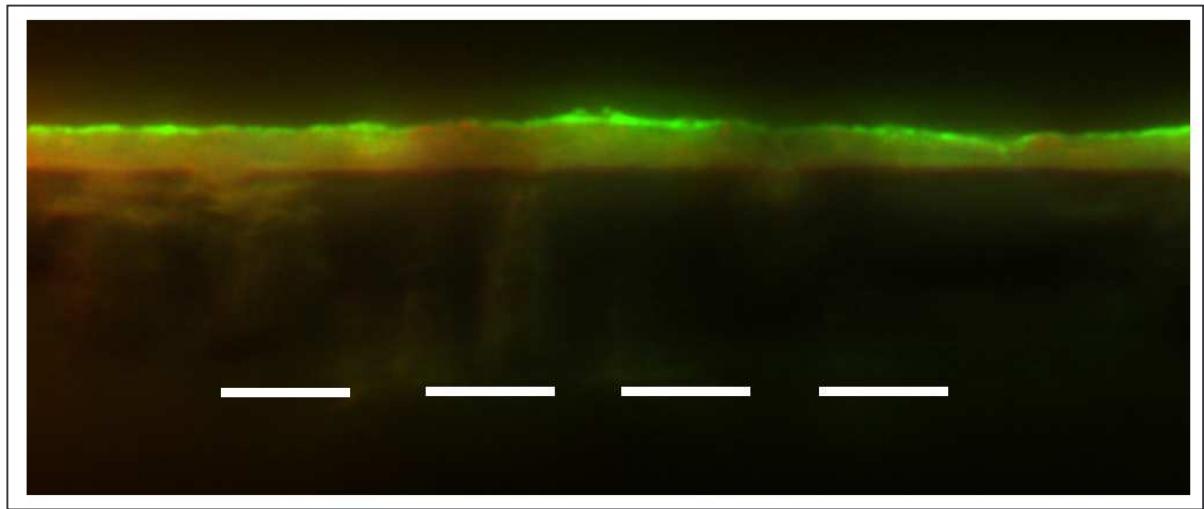


Abb. 3.36: Ein Kryoschnitt von MDCKII-MRP2-Zellen, die in einem Transwell gewachsen sind. MRP2 wird deutlich in der apikalen Domäne der Zellen exprimiert (grün). Die gestrichelte Linie zeigt das untere Ende der Transwell-Membran an (Dicke der Membran: 10 μm).

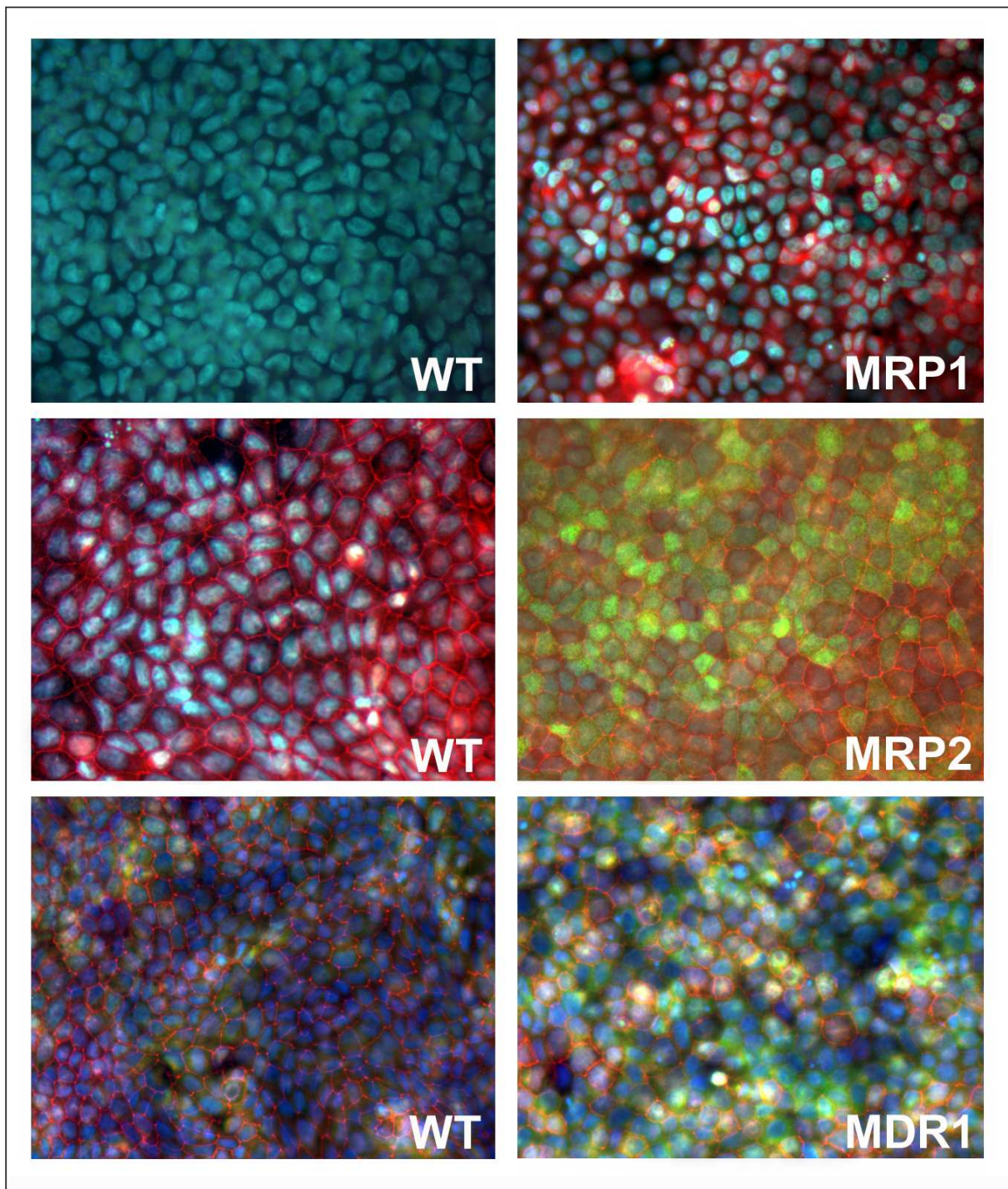


Abb. 3.37: Die Expression von MRP1 (obere Reihe), MRP2 (mittlere Reihe) und MDR1 (untere Reihe) in transfizierten Zellen (rechte Seite) und der Wildtypvariante (WT; linke Seite). Obere Reihe: MRP1 rot; mittlere Reihe: MRP2 grün, Zona Occludens 1 (ZO-1) rot; untere Reihe: MDR1 grün, ZO-1 rot; in allen Bildern sind die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.4.2 Transporterexpression in MDCKII-Wildtyp-Zellen

Die MDCKII Zellen (isoliert aus einem Cockerspaniel, *Canis familiaris*) exprimieren Transporter-Homologe der hepatobiliären Transporter (Abb. 3.38). Mrp2 wird sehr schwach sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene exprimiert. Mdr1 hingegen erscheint relativ stark, wenn auch deutlich geringer als die überexprimierenden Zellen exprimiert zu werden. Für Mrp3 konnte im Westernblot eine Bande detektiert werden (Abb. 3.34), die wahrscheinlich das canine Mrp3 darstellt und deutlich langsamer läuft (ca. 190 kDa) als die Banden für die glykosylierte und unglykosylierte Form des humanen Mrp3 (ca. 160 bzw. 140 kDa). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus verschiedenen RT- und RTD-PCRs für Caco-2, MDCKII-, HepG2- und Huh7-Zellen sind in Tabelle 3.6 abzulesen.

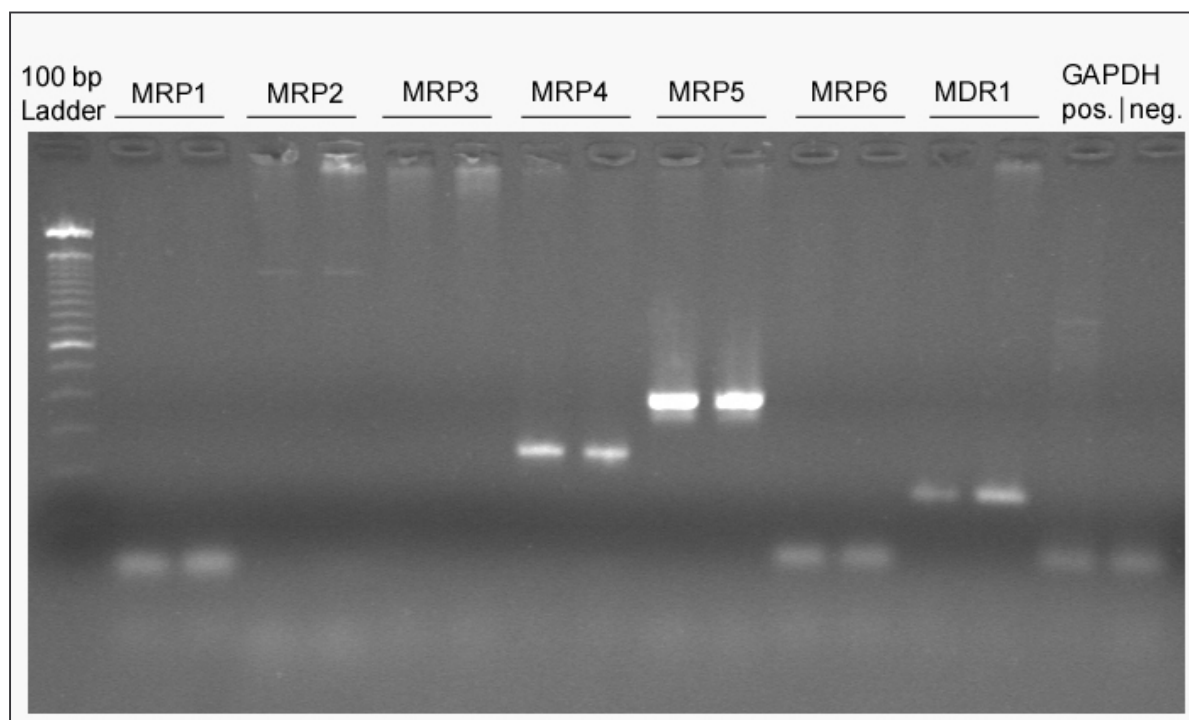


Abb. 3.38: RT-PCR MDCKII-WT-Zellen: Mrp1 525 bp, Mrp2 1254 bp, Mrp3 828 bp, Mrp4 244 bp, Mrp5 381 bp, Mrp6 888 bp, Mdr1 157 bp, GAPDH 788 bp; 1.5 %Agarosegel.

	BSEP	MDR1	MRP1	MRP2	MRP3	MRP4	MRP5	MRP6	NTCP	OATP2
MDCK II	n.d.	+	(-)	weak	-	+	+	-	-	-
MDCK II- MRP2	n.d.	+	(-)	+	-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
Caco2	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
HepG2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Huh7	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	+

Tabelle 3.6: mRNA Expressionsmuster für verschiedene Zelltypen. Da für BSEP, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, NTCP und OATP2 die Sequenzen von *Canis familiaris* nicht bekannt sind, wurden dieselben Primer wie für die humanen Transporter verwendet. Der antisense-Primer von MRP1 trägt einen Mismatch am 3'-Ende, wodurch eventuell ein falsch-negatives Resultat entsteht. n.d.= nicht durchgeführt.

3.4.3 Bestimmung der TEER

Die Messungen des RPMI- und DME-Mediums lagen bei 5Ω , die für PBS bei 9Ω (gemessen ohne Transwell). Die Leerwerte R_M lagen für 24 unterschiedliche Transwells bei $94.7 \Omega\text{cm}^2$ ($SD \pm 5.6$). Die gemessenen TEER-Werte für MDCKII-WT Zellen betrugen bei Aussaat von 5×10^5 Zellen/ cm^2 nach drei Tagen Kultur im Schnitt $95.5 \pm 7 \Omega\text{cm}^2$, für MDCKII-MDR1 $218.6 \pm 40.2 \Omega\text{cm}^2$, für MDCKII-MRP1 $87.1 \pm 7.8 \Omega\text{cm}^2$, für MDCKII-MRP2 $57.5 \pm 16.6 \Omega\text{cm}^2$, für MDCKII-MRP3 $72.6 \pm 10.3 \Omega\text{cm}^2$ und für Caco-2 Zellen bei $133.9 \pm 3.4 \Omega\text{cm}^2$ (Tabelle 3.7).

	Leer	MDCKII-					Caco2
		WT	MDR1	MRP1	MRP2	MRP3	
R_M	94.7	-	-	-	-	-	-
R_G	-	190.2	313.3	181.8	152.2	167.3	228.6
R_Z	-	95.5	218.6	87.1	57.5	72.6	133.9
SD	5.6	7.0	40.2	7.8	16.6	10.3	3.4

Tabelle 3.7: Durchschnittliche TEER-Werte der entsprechenden Zelllinien nach drei Tagen Kultur bei $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ausgesäten Zellen im 12-Well Format (Costar Cat. Nr. 3414; $n = 24$).

R_M = Widerstand der Membran; R_G =Widerstand von Zellen und Membran; $R_Z = R_G - R_M$ =Widerstand der Zellen; SD = Standardabweichung des Widerstandes R_Z der Zellen.

3.4.4 Kulturdauer und TEER

Wenn die TEER im Laufe der Kulturdauer bei MDCKII-WT Zellen beobachtet wurde, konnte festgestellt werden, dass die TEER an Tag eins und zwei auf $123 \Omega\text{cm}^2$ zunimmt, um dann wieder etwas abzufallen und sich stabil bei ca. $90 \Omega\text{cm}^2$ einzupendeln (siehe Abb. 3.39, Tabelle 3.8). Dieser Anstieg und Abfall war auch bei den MDCKII-MDR1-Zellen zu beobachten (siehe Abb. 3.40). Ein Wechsel des Mediums hatte, bei gleicher Temperatur, auf die Messungen keinen signifikanten Einfluss (Tabelle 3.8, Tag 3: A, vor dem Wechsel des Mediums; B, frisches Medium).

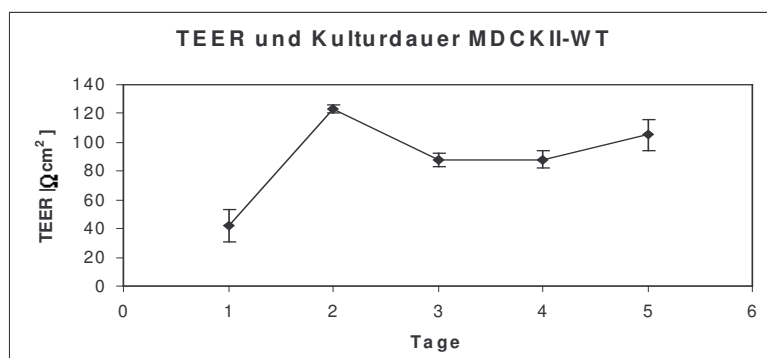


Abb. 3.39: Zunahme und Abnahme der TEER mit der Dauer der Kultur bei MDCKII-WT Zellen.

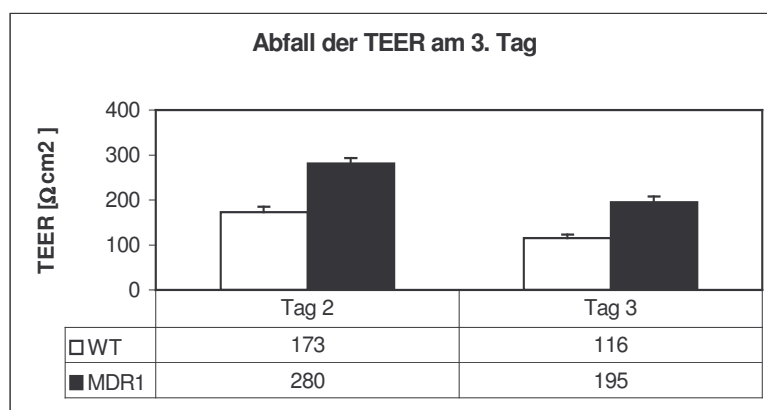


Abb. 3.40: Die TEER-Werte von MDCKII-MDR1 und -WT Zellen fallen am dritten Tag nach Kulturbeginn wieder ab. Alle Werte in Ωcm^2 .

MDCKII-WT Well Nr.	Tag 1	Tag 2	Tag 3		Tag 4	Tag 5
			A	B		
1	150	219	185	187	179	201
2	121	220	179	194	172	200
3	150	215	184	203	174	192
4	133	212	182	202	178	172
5	142	216	179	184	176	191
6	137	214	172	180	163	182
7 (leer; R_M)	98	94	95	105	87	88
8 (leer; R_M)	95	92	92	98	84	81
MW R_G	139	216	180	192	174	190
MW R_M	96.5	93	93.5	101.5	85.5	84.5
R_Z	42	123	87	90	88	105

Tabelle 3.8: 5×10^5 Zellen/cm² wurden im Transwell im 12-Well-Format (Corning 3414) ausgesät. Die TEER (Ωcm^2) wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich bestimmt. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus drei Messungen. A vor Wechsel und B nach Wechsel des Mediums. R_M = Widerstand der Membran; R_G =Widerstand von Zellen und Membran; R_Z =Widerstand der Zellen.

3.4.5 Temperaturabhängigkeit der TEER-Messungen

Bei einer Temperaturniedrigung stieg der gemessene Widerstand, bei einer Erhöhung sank er (Abb. 3.41). Daher sollte für eine reproduzierbare Messung der Transwell erst gemessen werden, wenn das Medium sich der Raumtemperatur angepasst hat.

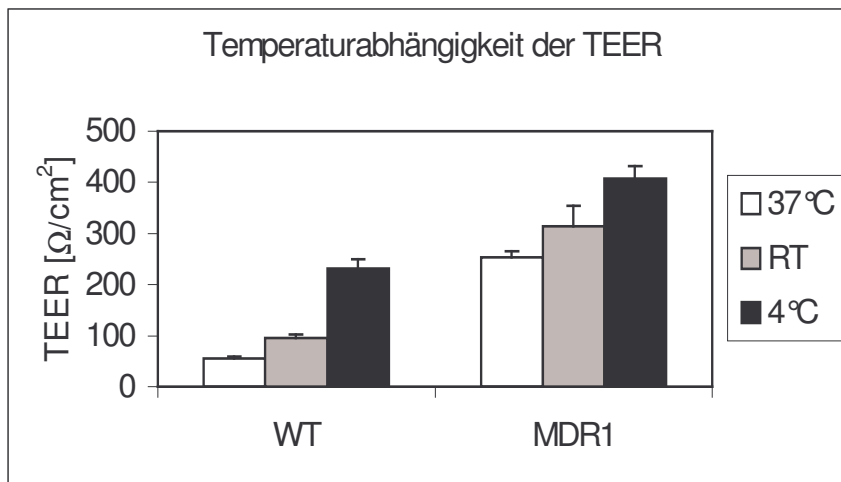


Abb. 3.41: Temperaturabhängigkeit des TEER-Wertes bei MDCKII-WT und MDCKII-MDR1 Zellen.

3.4.6 Messung der Substanzen im SPE-HPLC-MS/MS

Die Konzentration von Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus wurde mit Hilfe einer High Performance Liquid Chromatographie - Tandem Massenspektrometrie mit integrierter On-Line Solid Phase Extraction (SPE-HPLC-MS/MS) bestimmt.

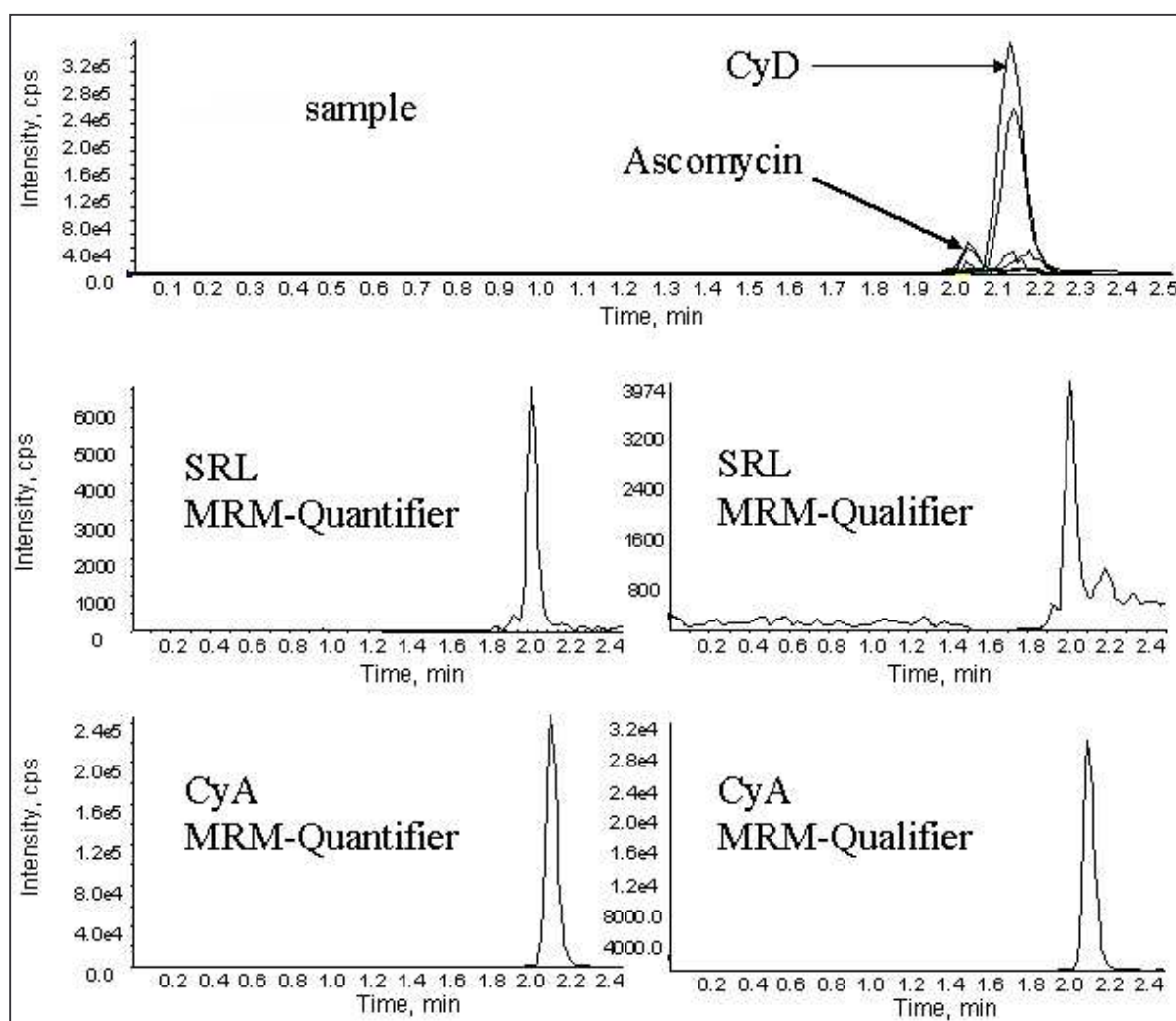


Abb. 3.42: Chromatogram einer gleichzeitigen Bestimmung von CsA und SRL. Oben sind die Chromatogramme der internen Standards Ascomycin (20 ng/ml) und Ciclosporin D (100 ng/ml) zu sehen, darunter die MRM-Übergänge von SRL bzw. CsA (CyA). Die Signale der Qualifier sind weniger intensiv als die Signale der Quantifier.

Die Verwendung der HPLC-MS im MRM Detektionsmodus ermöglichte die simultane Detektion mehrerer Substanzen (Abb. 3.42).

Die untere Grenze der Detektion liegt für Ciclosporin bei 1.3 ng/ml, für Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus bei 0.1 ng/ml. Für eine sichere Quantifizierung liegt der Wert für Ciclosporin bei 10 ng/ml, für Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus bei 1.0 ng/ml. Da beim Einsatz von

jeweils 5 μM Substrat (CsA, TRL, SRL oder RAD) diese Schwellenwerte in der Regel unter den Messwerten lagen, ist diese Methode für die in dieser Arbeit durchgeführten Transportstudien geeignet.

Präzision und Reproduzierbarkeit wurden durch Berechnung der relativen Standardabweichung (RSD) durch Messung von Kontrolllösungen (50 ng/ml CsA bzw. 5 ng/ml SRL, RAD, TRL; $n=100$) bestimmt. Alle RSD lagen zwischen 10 und 15 %.

Die zur Mengenbestimmung benutzten Standardkurven blieben linear zwischen den getesteten Konzentrationen (1-80 ng für SRL, RAD, TRL und 10-700 ng für CsA) und zeigten einen Korrelationskoeffizienten r^2 zwischen 0,9996 und 0,9999 (Abb. 3.43).

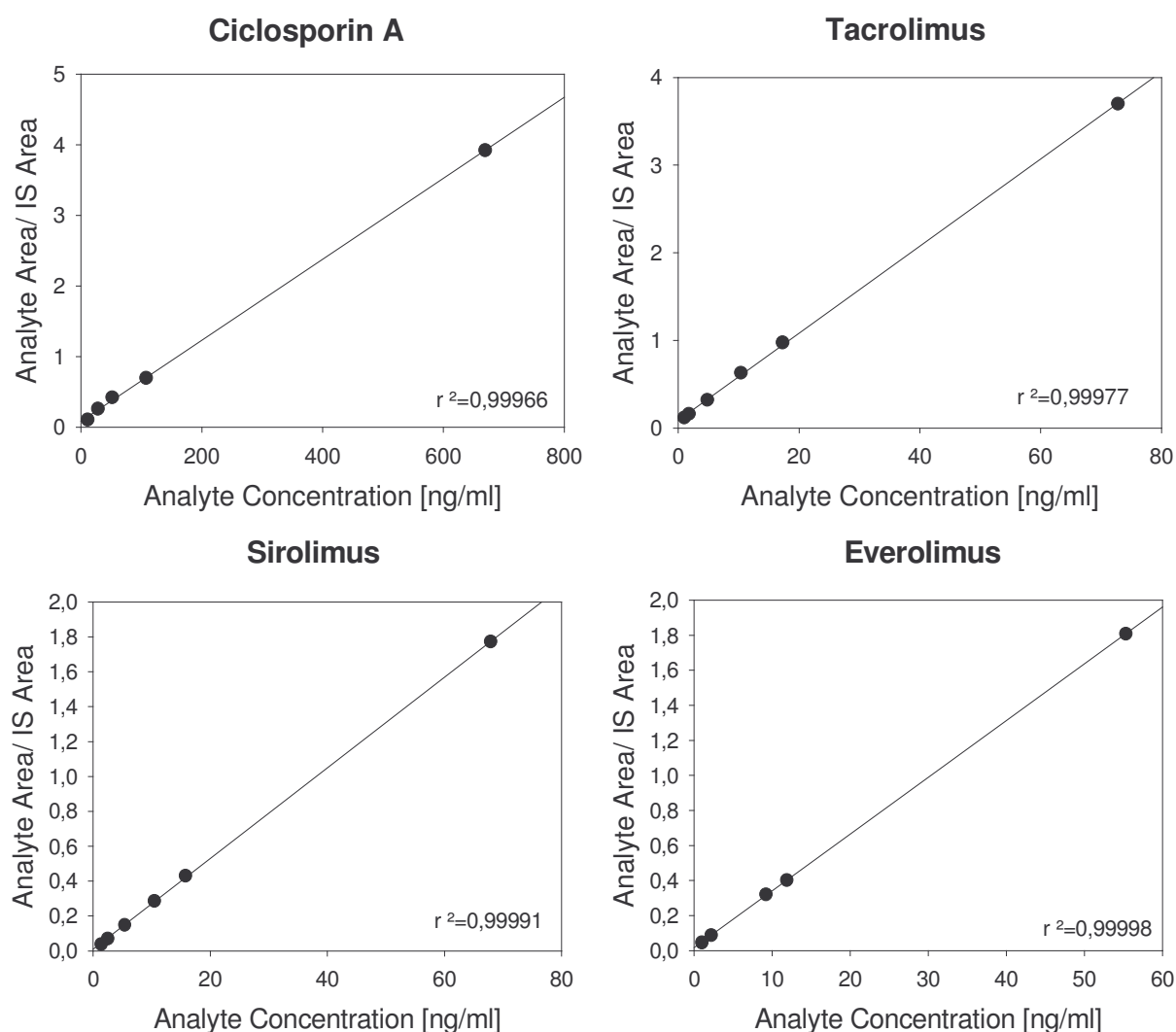


Abb. 3.43: Beispiele für die zur Messung von Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus verwendeten Standardkurven.

3.4.7 Transport von Immunsuppressiva durch Monolayer

Um festzustellen, ob Ciclosporin (CsA), Tacrolimus (TRL), Sirolimus (SRL) und Everolimus (RAD) Substrate von MDR1, MRP1, MRP2 oder MRP3 sind, wurden Transportstudien mit entsprechend transfizierten Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp (WT) im Transwell-System durchgeführt.

Der Transport der oben genannten Substrate erfolgte in den MDCKII-WT Zellen aufgrund der Polarität der Zellen und des endogenen Transportsystems drei- bis viermal stärker von basal nach apikal (BtoA), als von apikal nach basal (AtoB) (Abb. 3.44). Um den Transport rechnerisch zu erfassen, wurde die scheinbare Permeabilität (apparent Permeability P_{app} [cm/s]) und die Transportrate (BtoA/AtoB) berechnet. Je höher der Wert, desto stärker erfolgt ein Transport des Substrats von einem Kompartiment in das andere.

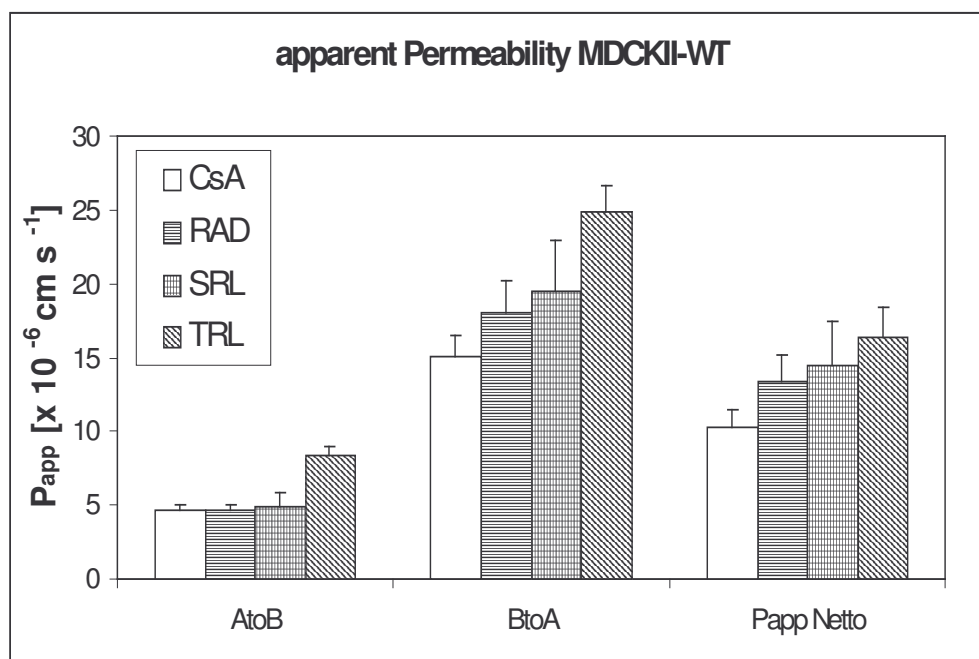


Abb. 3.44: Die P_{app} -Werte der einzelnen Transporte von apikal nach basal (AtoB) und basal nach apikal (BtoA), sowie des Netto-Transportes BtoA minus AtoB für je 5 μ M CsA, RAD, SRL und TRL in MDCKII-Wildtyp Zellen (n=4).

In der Abb. 3.42 werden die P_{app} -Werte der einzelnen Substanzen für MDCKII-WT Zellen verglichen. Es wurden jeweils 5 μ M Substrat eingesetzt. Die Permeabilität für CsA, SRL und RAD für den Transport von apikal nach basal war vergleichbar, mit P_{app} -Werten von 4.7, 4.9 bzw. 4.7×10^{-6} cm/s, die Permeabilität von TRL war mit 8.4×10^{-6} cm/s hierzu doppelt so hoch. Die Permeabilität des Transports von basal nach apikal war unterschiedlich stark, mit 15.0×10^{-6} für CsA, RAD mit 18.1×10^{-6} und SRL mit 19.4×10^{-6} cm/s. TRL wurde am

stärksten transportiert mit 24.9×10^{-6} cm/s. Der Transport von basal nach apikal war um das drei bis vierfache höher, als der Transport von apikal nach basal: die Rate BtoA/AtoB betrug 3.2 für CsA, 3.8 für RAD, 4.0 für SRL und 3.0 für TRL.

3.4.8 Transport von CsA, SRL und RAD durch MDR1

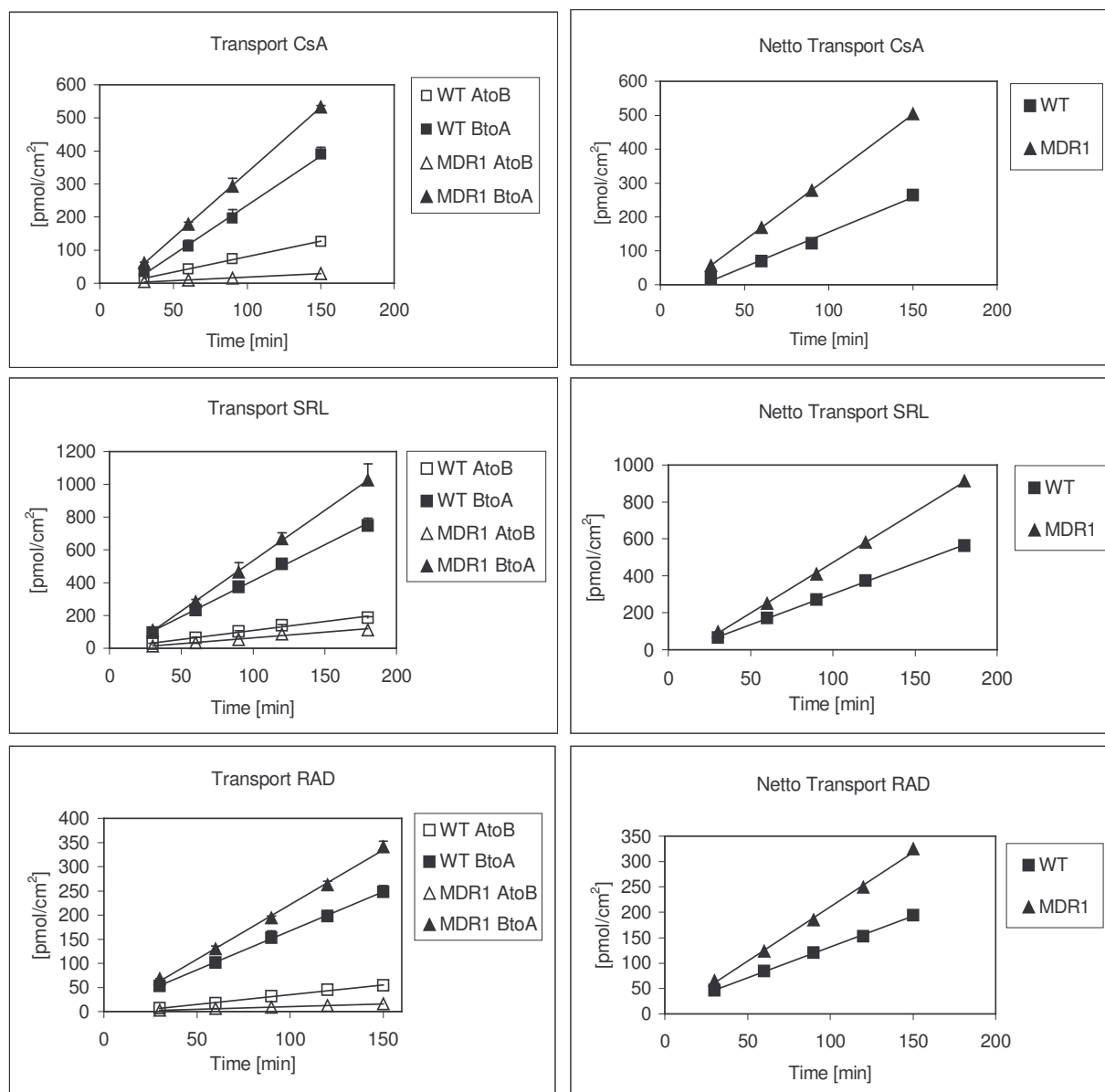


Abb. 3.45: Transport von CsA, SRL und RAD durch MDR1-überexprimierende-Zellen (MDR1) im Vergleich zum Wildtyp (WT). Auf der linken Seite sind die jeweiligen Einzeltransporte vom apikalen in das basal Kompartiment (AtoB) und umgekehrt (BtoA) gezeigt. Auf der rechten Seite ist die Netto-Fluxion aufgetragen. Darstellung als Funktion von Transport (pmol/cm²) zur Zeit, deren Steigung ein Faktor zur Berechnung des scheinbaren Transports (P_{app}) ist. Die Standardabweichung ist z. T. kleiner als die Symbole. Jeder Messpunkt n=3.

Da MDR1 in der apikalen Domäne der MDCKII-MDR1 Zellen exprimiert wird und eine Export-Pumpe ist, wird für ein Substrat von MDR1 erwartet, dass der Transport apikal nach basal in MDR1 überexprimierenden Zellen geringer bzw. der von basal nach apikal höher ist als im WT. In MDCKII-MDR1 Zellen war der Transport für alle Substrate stärker als im WT und somit die Steigung in der Funktion pmol/cm^2 pro min höher. Abb. 3.45 zeigt auf der linken Seite einen Vergleich der einzelnen Transportfunktionen von WT und MDR1 Zellen, in denen der Transport (pmol/cm^2) von $5 \mu\text{M}$ eingesetztem Substrat gegen die Zeit aufgetragen wurde. Ein deutlicher Unterschied in der Transportgeschwindigkeit von AtoB im Vergleich zu BtoA ist zu erkennen. Alle Substrate wurden stärker in den überexprimierenden Zellen transportiert. In Abb. 3.45 ist auf der rechten Seite die Netto-Fluxion BtoA minus AtoB zu erkennen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden wurden die Werte für die scheinbare Permeabilität ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten r^2 lagen zwischen 0.9765 und 0.9999.

In MDR1-überexprimierenden MDCKII-MDR1 Zellen war die P_{app} der Substanzen deutlich höher als im WT (siehe Abb. 3.46). Für CsA war die Netto P_{app} in den MDCKII-MDR1 Zellen fast doppelt so hoch im Vergleich zu den MDCKII-WT Zellen (10.6 im WT zu $19.3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$). Bei RAD war die P_{app} ebenfalls ungefähr um den Faktor zwei stärker als im WT, und zwar 26.0 (MDR1) zu $14.7 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (WT). SRL wurde ebenfalls stärker von MDR1-transfizierten Zellen transportiert ($28.6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$), als von WT Zellen ($15.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$).

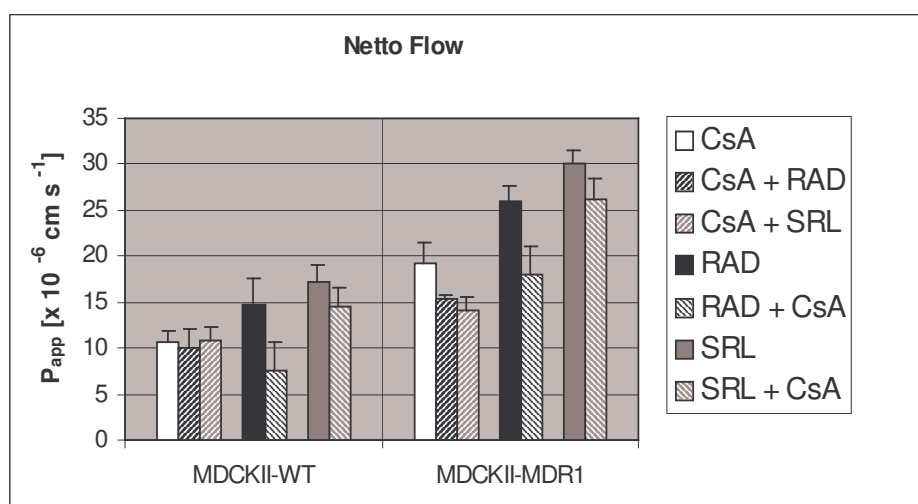


Abb. 3.46: Die einzelnen P_{app} -Werte aus der Netto Fluxion für CsA, RAD und SRL allein und in Kombination. Links der Netto-Transport in WT-Zellen, rechts der der MDCKII-MDR1 Zellen.

Durch die Kombination von $5 \mu\text{M}$ CsA mit je $5 \mu\text{M}$ RAD bzw. mit SRL zeigte sich sowohl in den WT Zellen, also auch in den MDR1-überexprimierenden Zellen ein verminderter Transport der Substanzen: während der Transport von CsA im WT unverändert zu sein schien, war der

Transport in den MDR1 Zellen um 20 % (RAD) bzw. 27 % (SRL) vermindert. Der Transport von RAD und SRL wurde durch CsA sowohl in den WT Zellen, als auch in den MDR1 Zellen gehemmt: der Transport von SRL wurde um 16 % (WT) bzw. 12 % gemindert; der Transport von RAD wurde noch stärker durch die Anwesenheit von CsA beeinflusst, der P_{app} -Wert sank signifikant ($p < 0.001$) auf 51 % (WT) bzw. 69 %.

Substrat	Inhibitor	Rate [BtoA/AtoB]	
		MDCKII-WT	MDCKII-MDR1
CsA		3.2	18.8
CsA	RAD	3.7	16.7
CsA	SRL	3.2	10.4
RAD		3.8	20.0
RAD	CsA	2.4	8.4
SRL		4.0	13.9
SRL	CsA	3.2	8.8

Tab. 3.9: Der P_{app} -Wert für den Transport basal nach apikal, geteilt durch den P_{app} -Wert für den Transport von apikal nach basal ergibt die Transportrate. Die Rate war in den MDCKII-MDR1 Zellen um das drei- bis sechsfache höher als im WT.

Die Rate ($P_{app} \text{ BtoA} / P_{app} \text{ AtoB}$) war in den MDR1 transfizierten Zellen drei- bis sechsmal höher als im WT (siehe Tab. 3.9). Dieses spiegelt sowohl den verringerten AtoB-Transport, als auch den höheren BtoA Transport der MDCKII-MDR1 Zellen wider.

Das Transportverhältnis BtoA/AtoB wurde im Wildtyp durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht signifikant beeinflusst (Tab. 3.9). Bei den MDCKII-MDR1 Zellen war das Transportverhältnis der Substanzen in Kombination dagegen deutlich niedriger im Vergleich zur jeweiligen Substanz allein.

Wurde der Transport von Everolimus genauer betrachtet (Abb. 3.47), dann fiel auf, dass der basale nach apikale Transport durch Ciclosporin sowohl im WT als auch in den MDR1-überexprimierenden Zellen gehemmt wurde. Der Transport von apikal nach basal blieb unverändert.

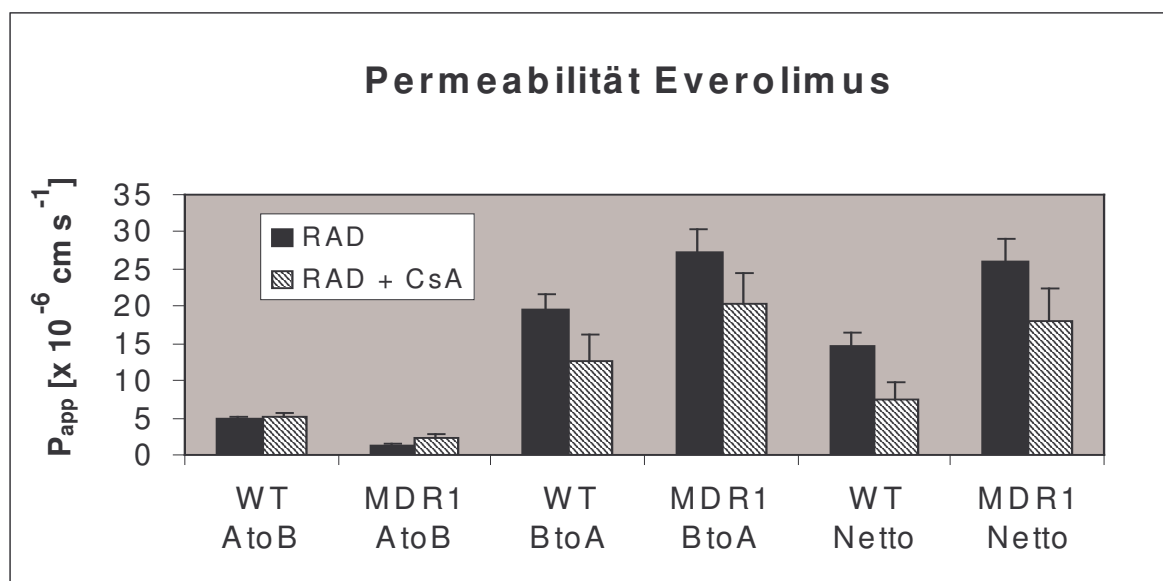


Abb. 3.47: Die P_{app} -Werte von Everolimus für den apikal- nach basalen (AtoB) und den basal- nach apikalen Transport (BtoA).

3.4.9 Berechnung von K_m und V_{max} für Ciclosporin

Für die Berechnung von K_m und V_{max} wurde der Transport von unterschiedlichen Konzentrationen CsA (5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 und 0.15 μM) im Transwell für MDCKII-WT und MDCKII-MDR1 Zellen gemessen (Abb. 3.48). Wenn die Werte als Lineweaver-Burk Diagramm aufgetragen werden (Abb. 3.49), kann die K_m und die V_{max} bestimmt werden. Die errechnete K_m für den Transport in MDCKII-WT beträgt 12 μM und für MDCKII-MDR1 27 μM , V_{max} für WT 11110 $\text{pmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ und für MDR1 16670 $\text{pmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Tab. 3.10).

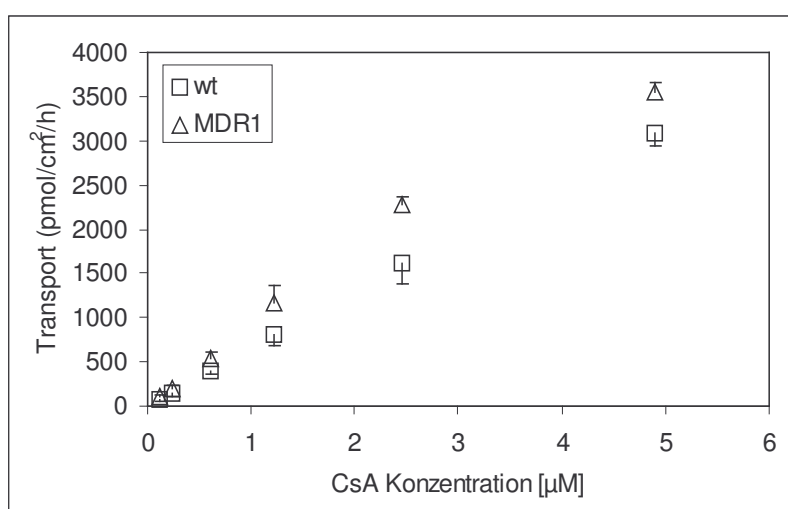


Abb. 3.48: die transportierte Menge CsA in $\text{pmol}/\text{cm}^2/\text{h}$ im Vergleich zur eingesetzten Konzentration

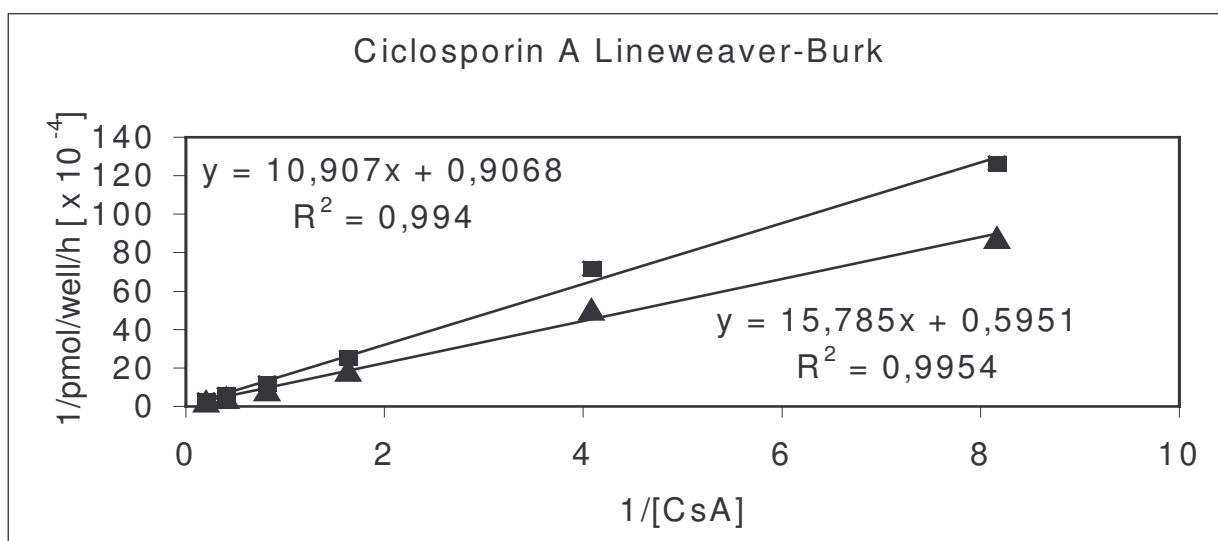


Abb. 3.49: Darstellung des Transports unterschiedlicher Konzentrationen zur Berechnung von K_m und V_{max} als Lineweaver-Burk Diagramm. Quadrat: Wildtyp; Dreieck: MDR1-überexprimierende Zellen.

	K_m [μM]	V_{max} [$\mu mol/cm^2/h$]
MDCKII-WT	12	11110
MDCKII-MDR1	27	16670

Tabelle 3.10: Die mit Hilfe des Lineweaver-Burk Diagrams ermittelten Werte für K_m und V_{max} für beide Zelllinien.

3.4.10 Transport von CsA, TRL, SRL und RAD durch MRP1

Es wurden ebenfalls Transportstudien mit CsA, TRL, SRL und RAD in MRP1 überexprimierenden Zellen (MDCKII-MRP1) durchgeführt und mit dem Transport in WT-Zellen verglichen. Da MRP1 in der basolateralen Domäne der MDCKII-MRP1 Zellen exprimiert wird und eine Export-Pumpe ist, ist davon auszugehen, dass ein Substrat von MRP1 einen geringeren Transport von basal nach apikal und einen stärkeren Transport apikal nach basal zeigt als im WT. Werden die P_{app} -Werte miteinander verglichen, findet sich für RAD und TRL kein Unterschied zwischen WT und MDCKII-MRP1 Zellen. Bei CsA und SRL hingegen war die Netto Fluxion deutlich niedriger (siehe Abb. 3.50), was darauf hindeuten würde, dass CsA und SRL Substrate des MRP1 sein könnten. Die Netto Fluxion von CsA sank von 9.4 im WT auf 6.0×10^{-6} cm/s, die von SRL von 11.5 auf 6.1×10^{-6} cm/s. Die Transportrate sank ebenfalls, von 3.2 auf 2.5 für CsA und von 3.9 auf 2.7 für SRL. Die Raten für TRL und RAD blieben unverändert, mit 3.0 im WT zu 3.2 für TRL und mit 3.7 im WT zu 3.2 für RAD.

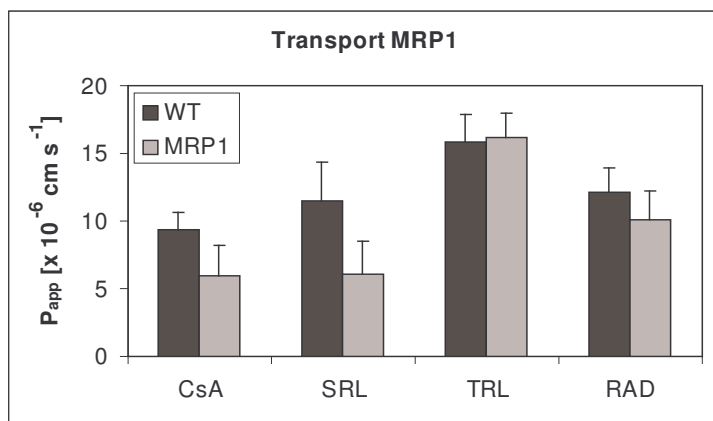


Abb. 3.50: Für CsA, SRL, TRL und RAD sind die Netto P_{app} -Werte für den Wildtyp (WT) und MDCKII-MRP1 (MRP1) Zellen aufgetragen.

3.4.11 Transport von CsA, TRL, SRL und RAD durch MRP2 und MRP3

Für den Transport eines Substrates wird für MRP2 erwartet, dass es vermehrt in das apikale Kompartiment transportiert wird, für MRP3 stärker in das basale. Werden die einzelnen Werte miteinander verglichen, findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied für den Transport von 5 μM CsA, TRL, SRL oder RAD in den MDCKII-MRP2 und MDCKII-MRP3 Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 3.11).

Substrat	Inhibitor	Rate (BtoA/AtoB)		Netto P _{app} [x 10 ⁻⁶ cm s ⁻¹]	
		WT	MRP2	WT	MRP2
CsA	TRL	3.4	4.8	11.9	11.6
SRL		3.8	4.4	14.6	12.5
SRL		3.4	4.0	9.4	7.5
TRL		3.3	3.1	18.3	14.5
TRL	SRL	2.7	3.4	12.0	12.1
RAD		2.6	4.0	4.7	11.8
Substrat		WT	MRP3	WT	MRP3
CsA		3.0	3.8	9.4	12.1
SRL		3.4	4.9	12.1	16.5
TRL		3.0	3.8	15.8	20.6
RAD		2.6	3.8	4.2	6.9

Tabelle 3.11: Der Transport von MRP2 und MRP3 war sowohl in der Rate, als auch im Netto P_{app} -Wert in MDCKII-MRP2 und MDCKII-MRP3 Zellen nicht signifikant unterschiedlich.

4. DISKUSSION

4.1 Analyse differentieller Genexpression

In der Diagnostik und Grundlagenforschung spielt die Quantifizierung von Nukleinsäuren eine immer bedeutendere Rolle. In jüngster Zeit hat die Entstehung der molekularen Medizin eine Vielzahl an Techniken hervorgebracht, die RNA-Level in der klinischen Diagnostik quantifizieren können. Diese Techniken ermöglichen z.B. die Quantifizierung der Regulation und Expression von Drug Resistance Markern in Tumorzellen⁹⁶, die Überwachung der Chemotherapie⁹⁷, das Messen der Verteilung und der Transkription von genkodierten Therapeutika⁹⁸, das Tumor Staging⁹⁹, die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen¹⁰⁰ und bakteriellen¹⁰¹ und viralen¹⁰² Pathogenen.

In der Grundlagenforschung sind die Microarray Analyse¹⁰³ und das Differential Display für die Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene populäre Techniken geworden. Einmal entdeckt, müssen diese variierenden mRNA-Level bestätigt werden.

Die vier wichtigsten Methoden zur Messung unterschiedlicher Expressionen sind der Northern Blot, die in situ Hybridisation, der Ribonuklease Protektionsassay (RPA) und die RT-PCR. Von diesen Methoden ist die RT-PCR die sensitivste und flexibelste Methode zur Quantifizierung von RNA¹⁰⁴. Theoretisch könnte eine einzige Kopie eines Transkripts detektiert werden, praktisch werden allerdings 10 bis einige hundert Kopien für eine verlässliche Quantifizierung benötigt.

Die RNA kann dabei leicht angedegradiert sein, da nur eine kurze Sequenz amplifiziert wird. Mit der RT-PCR können mRNA-Expressionslevel zwischen verschiedenen Probenpopulationen verglichen oder zwischen verschiedenen Allelen und RNA-Strukturen unterschieden werden. Im Gegensatz zum Northern Blot oder dem RPA kann eine RT-PCR keine Aussage über die Qualität der RNA, Größe des Transkripts, Splice-Varianten, Intron/Exon Grenzen, Transkriptionsstart und Termination treffen.

Von allen RT-PCR Methoden zur Quantifizierung von Transkripten ist die Real-Time-Detection PCR (RTD-PCR oder Q-PCR) das eleganteste Verfahren, mit einem breiten Messbereich, keiner Prozessierung von PCR-Produkten, einem hohen Probenumsatz und dem Potential zur Automatisierung.

Im Gegensatz zu der RTD-PCR ist die kompetitive PCR, bei der ein externer Standard der Probe beigemischt wird, und die Multiplex PCR, bei der ein interner Standard mit einem

zusätzlichen Primerpaar mitvermehrt wird, besonders arbeitsintensiv und teuer. Da mehrere RT und PCR Schritte pro Probe nötig sind, steigt der Aufwand und die Kosten, je mehr Proben und Target untersucht werden sollen. Bei diesen semi-quantitativen Messmethoden muss ausserdem darauf geachtet werden, dass die Reaktion gestoppt wird, solange sich die PCR in der exponentiellen Phase befindet, denn durch Limitierung der Reaktionskomponenten und anderer Faktoren nimmt die Effizienz ab und die Reaktion erreicht ein Plateau. Dieses Problem tritt bei der RTD-PCR nicht auf, da durch Verwendung des C_T -Wertes bzw. des Crossing Points (CP) eine Messung am Anfang der exponentiellen Phase möglich ist.

Ausserdem ist eine Färbung des PCR-Produktes mit Ethidiumbromid im Agarosegel eine relativ unsensitive Methode, um DNA zu quantifizieren. Die untere Detektionsgrenze einer Bande liegt bei 5 bis 10 ng. Wenn 10 μ l einer PCR aufgetrennt werden, heisst das, dass das Minimum an Ausbeute der PCR Reaktion 25–50 ng sein muss. Wenn das obere Limit einer PCR im Plateau 500 ng ist, ist die dynamische Breite des Systems (untere Detektionsgrenze und Ende des linearen Bereiches) eine log-Stufe. Wenn also die Expression eines Targets um mehr als eine log-Stufe variiert, dann werden bei der Quantifizierung Fehler auftreten. Durch andere Farbstoffe, wie z.B. Syber Green oder Silberfärbung, wird die Sensitivität und damit der dynamische Bereich des Systems zwar erhöht, aber der breite, lineare Messbereich der RTD-PCR von ca. 10 Log-Stufen niemals erreicht.

Für die Analyse von Nukleinsäuren vor ihrem Einsatz in der RTD-PCR ist der Bioanalyzer ein schnelles und für die Messung kleiner Mengen geeignetes Verfahren. Es wird eine Probenmenge von nur 5-500 ng RNA benötigt als bei herkömmlichen Verfahren.

Die durch den Bioanalyzer bestimmte Konzentration hat einen Variationskoeffizienten von ca. 10 %. Da Konzentrationsschwankungen in der RNA-Menge durch Normalisierung mit einem „Housekeeping“-Gen (siehe unten) ausgeglichen wurden und die Standardkurve für eine relative Quantifizierung benutzt wurde, hatte dieses keine Auswirkungen auf die Ergebnisse.

Mit Hilfe des Bioanalyzers konnte gezeigt werden, dass die verwendete Methode zur Isolierung von RNA aus humanem Lebergewebe und der Zellkultur den Ansprüchen der RTD-PCR genügt: weder konnte eine Degradation der RNA festgestellt werden, noch eine Kontamination mit DNA. Ebenso konnte die Spezifität der PCR demonstriert werden.

Die angewandten Aufreinigungsmethoden für Nukleinsäuren kommen ohne die Verwendung oder Anreicherung von PCR-Hemmstoffen, wie z.B. Heparin oder Porphyrinverbindungen, aus, weshalb sie für den Einsatz in der RTD-PCR geeignet sind.

Die im Gegensatz zu den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) etwas niedrigere Ausbeute an RNA, ca. 3 µg RNA je mg Lebergewebe statt ca. 4 µg/mg (Lebergewebe *Mus musculus*), lässt sich eventuell mit der Homogenisationsmethode erklären, bei der ein Teil des Gewebes im Mörser haften bleibt. Die Ausbeute ist aber von geringer Relevanz für die RTD-PCR. Es war nicht nötig, die mRNA aufzureinigen, da die PCR effizient genug arbeitete.

Für den ersten Schritt in der RTD-PCR, der reversen Transkription (RT), wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Diese werden, neben Random-Hexamer Primern (Hexanucleotide mit einer statistischen Basenfolge) und Spezifische Primer (wenn ein seltenes Transkript nachgewiesen werden soll), hauptsächlich als Primer für die RT-PCR verwendet. Die Wahl der Primer für die RT ist jedoch nicht von großer Bedeutung, abgesehen von dem Fall, in dem mit RNA ohne Poly-A-Schwanz gearbeitet wird, z.B. wenn ribosomale RNA als interner Standard benutzt wird oder bakterielle Transkripte nachgewiesen werden sollen.

Für die RTD-PCR kann die RT entweder im gleichen Reaktionsgefäß als extra Zyklus vor der PCR ausgeführt werden (One Tube), oder räumlich getrennt, so dass erst die cDNA in den PCR-Ansatz gegeben wird (Two Tube). Es wurde eine Two-Tube RTD-PCR gewählt, da die Trennung von RT und PCR den Vorteil hat, dass ein cDNA Pool generiert wird, der lange gelagert werden kann. Zwar hat eine One-Tube RTD-PCR ein geringeres Kontaminationsrisiko, es traten aber keine Probleme mit positiven Negativkontrollen auf. Für eine Automatisierung, z.B. in der Diagnostik, überwiegen aber die Vorteile einer One-Tube RTD-PCR.

Es wurde darauf geachtet, dass die cDNA-Lösung genug Kopien des Templates enthielt, vorzugsweise sollten ca. 10.000 bis 100.000 Kopien in weniger als 500 ng RNA pro 50 µl Reaktionsmix eingesetzt werden, um ein Signal zwischen 25 und 30 Zyklen zu erhalten. Niedrige Mengen verursachen einen C_T -Wert größer als 30, Mengen über 1 µg führen zu einer Hemmung der PCR. Ein Vergleich mit den verwendeten Standardkurven zeigte, dass sowohl Kopienzahl, als auch C_T -Wert in alle Reaktionen in den angestrebten Messbereich passte. Einzige Ausnahme bildete MRP1, das mit ca. 2000 eingesetzten Kopien pro 50 µl Reaktionsmix erst ein Signal nach 30 Zyklen ergab.

Es wurden Unterschiede in der Effizienz verschiedener RT-Reaktionen trotz umfangreicher Standardisierungsverfahren beschrieben, die die Ergebnisse einer Quantifizierung stark beeinflussen und verfälschen können¹⁰⁵. Durch die sekundären Strukturen, die die RNA ausbildet, kann die Arbeitsfähigkeit der RNA-abhängigen DNA Polymerase eingeschränkt werden^{106,107}. Dieses kann eine Quantifizierung beeinflussen, ebenso die Natur des Primers. Die Effizienz einer RT-Reaktion kann daher zwischen 5 % und 90 % liegen, was eine absolute Quantifizierung stark erschwert. Zwar kann ein RNA-Template in bekannter Menge zur Überprüfung der Effizienz der Probe beigemischt werden, doch dieses ist sehr aufwendig und die Ergebnisse zweifelhaft. Daher wurde in dieser Arbeit, wie in den meisten Publikationen, nur eine relative Quantifizierung durchgeführt. Es wurden zwar Standardkurven in der Einheit „Kopienzahl“ eingesetzt, diese sollten aber lediglich der Orientierung dienen und nicht den Anspruch haben, absolut zu sein.

Bei der relativen Quantifizierung werden zwei Proben miteinander verglichen, nachdem die Targetmenge bzw. der C_T -Wert relativ zu einem Standard ermittelt wurde. Daher muss für eine relative Quantifizierung die Menge des Standards nicht bekannt sein, solange immer die gleiche Charge verwendet wird. Es kann entweder ein externer Standard, der der Probe beigemischt wird (kompetitive PCR), oder ein interner Standard verwendet werden.

Als interner Standard kann ein anderes oder mehrere andere Transkripte verwendet werden, die sich bereits in der Probe befinden und in gleicher Konzentration in allen Proben vorhanden sind. Einen solchen Standard wird als „Housekeeping Gen“ bezeichnet, die Abgleichung mit Hilfe eines internen Standards als Normalisierung. Dass selten zwei Templates mit der gleichen Effizienz vermehrt werden und der gewählte Standard oft auch einer Regulation unterliegt, sind die beiden größten Probleme einer Quantifizierung mit Hilfe der PCR.

Eine Quantifizierung kann anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt werden, die auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR Produkten, Plasmiden, in vitro transkribierter RNA, synthetisierter DNA- oder RNA-Oligomeren besteht. Kalibrierkurven sind gut reproduzierbar und erlauben die Erhebung von sehr spezifischen, sensitiven und reproduzierbaren Daten.

Im Vergleich zu frisch synthetisierter RNA sind Kalibrierkurven aus klonierter DNA und genomischer DNA sehr stabil und geben reproduzierbare Ergebnisse selbst nach langer Lagerung. Ausserdem ahmen die längeren Templates rekombinanter DNA die durchschnittliche mRNA mit einer Länge von 2 kb besser nach, als kürzere Templates von RT-

PCR Produkten oder Oligonukleotiden. Sie sind resistenter gegen einen unspezifischen Verdau und der Proofreading Aktivität der Polymerase während des Ansetzens der PCR. Der Vorteil kürzerer Templates ist die Zeitersparnis, die bei der Synthese, Aufreinigung, Klonierung, Transformation, Plasmidpräparation, Linearisierung, Verifizierung und exakten Bestimmung der Standardkonzentration benötigt wird. Kalibrierungsgeraden aus aufgereinigten RT-PCR Produkten oder Oligo-Nukleotiden sind allerdings instabil und es kommt zu Problemen mit Re-Amplifikation.

4.1.1 Wahl der internen Kontrolle („Housekeeping Gen“)

Eine Quantifizierung von RNA durch Northern Blot, Ribonuklease Protektionsassay oder durch die RT-PCR schliesst die Verwendung einer internen Kontrolle mit ein. Da die Analyse des Experiments auf dem Signal der internen Kontrolle aufbaut, ist die richtige Wahl ein wichtiger Aspekt des Versuchsdesigns. Wenn die Expression in unterschiedlichen Gewebetypen untersucht werden soll, ist es noch schwieriger, eine geeignete interne Kontrolle zu finden. Eine ideale interne Kontrolle, ein sogenanntes „Housekeeping Gen“ ist leicht zu Messen, die Expression variiert nicht während des Zellzykluses, zwischen Zelltypen oder Proben und reagiert nicht auf experimentelle Manipulationen (z.B. Stress, Medikamente, Krankheit).

Häufig zur Normalisierung benutzte Gene sind z.B. Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin Phosphorybosyl-Transferase (HPRT1), Tubulin (TUB) und β -Actin (ACTB). Ein Vergleich der Journals mit hohem Impact-Faktor des Jahres 1999 zeigte, dass in über 90 % der Fälle GAPDH, ACTB, 18S oder 28S rRNA als einziger interner Standard zur Normalisierung verwendet wurden¹⁰⁸.

Diese Gene werden in moderaten Mengen exprimiert und sind einfach zu detektieren. Unter vielen experimentellen Bedingungen zeigten sie sich als geeignet, aber das universelle Housekeeping-Gen existiert nicht, da diese ebenso einer Regulation unterliegen. Auch ACTB und GAPDH werden nicht immer konstant exprimiert. So kann sich ihre Expression sehr stark zwischen unterschiedlichen Geweben bzw. Zelltypen unterscheiden. Zusätzlich gibt es viele Berichte, dass die Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Krankheitsbildern verschieden sein kann oder sich durch die experimentelle Behandlungen verändern kann.

Oft wird rRNA als interne Kontrolle verwendet, da die eingesetzte rRNA-Menge von Probe zu Probe relativ konstant bleibt, wenn die Menge mit dem Photometer bestimmt wird (80 % der gRNA ist rRNA). Diese Menge ist auf der anderen Seite ein Problem, da die endogene Kontrolle in dem gleichen linearen Bereich wie das Target sein sollte. Ausserdem werden

Schwankungen zwischen der rRNA und mRNA Fraktionen beobachtet, die die Verwendung von rRNA als Housekeeping Gen ebenfalls zweifelhaft erscheinen lassen.

Auch für ACTB-Transkripte wurde gezeigt, dass sie nicht immer in gleichen Mengen vorliegen, z.B. wird ACTB achtfach niedriger in der Mausleber, als im Thymus oder der Milz exprimiert¹⁰⁹ und sehr heterogen in den Lymphknoten bei Hodgkin-Krankheit¹¹⁰.

Auf der anderen Seite zeigt ACTB nur geringe intraindividuelle Veränderungen in der Expressionsstärke und ist durch viele Krankheiten nicht primär betroffen. Auch für den Vergleich von Tumormarkern in Tumorzelllinien zeigte sich ACTB als geeignet. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Proben vor und nach Stimulation durch Sirolimus in HepG2-Zellen zeigte, dass ACTB nur geringe Variationen aufweist. Da letztlich jedes „Housekeeping“ Gen der Regulation unterliegt, von allen aber ACTB noch für die in dieser Arbeit durchgeführte Studie am besten geeignet erschien, wurde ACTB als interner Standard ausgewählt. Grundsätzlich empfiehlt es sich aber, nicht nur gegen ein „Housekeeping“ Gen zu normalisieren, sondern gegen mindestens drei.

Für ACTB existieren ca. 20 Pseudogene und nur ein aktiver Locus. Daher besteht die Gefahr, ein falsch-positives oder stärkeres Signal durch Kontamination mit genomischer DNA zu erhalten. Da aber eine Testamplifikation mit RNA als Template negativ war, ist davon auszugehen, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA trotz der Existenz von Pseudogenen die Messungen nicht signifikant beeinflusst.

4.1.2 Optimierung der PCR

Die verwendeten Primer und Sonden blieben zwischen einer $MgCl_2$ -Konzentration von 3 mM bis 6 mM und einem Temperaturbereich von 51.1 bis 60°C spezifisch. Im Agarosegel waren daher keine bzw. nur geringe Unterschiede zu erkennen. Da sich aber in der Auswertung der RTD-PCR zeigte, dass sich C_T -Wert, Standardabweichung der Triplets und die gemessene maximale Fluoreszenz voneinander unterschieden, wurden bei der Optimierung der Reaktionskomponenten immer auch die Daten aus der Real-Time-Messung mit einbezogen.

Die mit Primer3 erstellten Sequenzen für Primer und Sonden zeigten oft bereits unter Standard-Reaktionsbedingungen eine optimale Effizienz zwischen 90 und 100 %. Dieses zeigt, wie wertvoll Primer3 für die Generierung von Primer und Sonden ist. Nur in zwei Fällen mussten die Bedingungen verändert werden: es zeigte sich, dass ein zusätzlicher Temperaturschritt (10 sec 63°C) zwischen Denaturierung und Primerannealing die Effizienz der Reaktion für NTCP

und OATP-C deutlich erhöhte. Diese Temperatur liegt 8 bzw. 3 Grad unter der T_A der Sonde, aber noch über der T_A der Primer. Dieser Schritt wurde in der Hoffnung eingefügt, der Sonde zusätzliche Zeit zum Hybridisieren zu geben, bevor die Zweitstrang-Synthese die Bindungsstelle versperrt. Zusätzlich hat die Taq-Polymerase mehr Zeit für die Elongation der (im Vergleich zu den anderen Fragmenten) langen Templates.

Um kostengünstiger zu arbeiten, wurde die Menge des Reaktionsmixes, sowie die Konzentration kostspieliger Komponenten (Polymerase, Sonde) minimiert. 28 µl Reaktionsmix zeigte im Vergleich keinen Unterschied zu einer entsprechenden Reaktion mit 50 µl. Generell scheinen geringe Schwankungen in der Menge des Reaktionsmixes keine große Rolle zu spielen.

4.1.3 Reproduzierbarkeit

Die durchgeführten RTD-PCRs zeigten nach der Optimierung eine hohe Uniformität, eine breite Linearität und eine hohe Reproduzierbarkeit. Es zeigt sich eine geringe Variation von 1.4 % innerhalb der C_T -Werte, die auf Abweichungen bei der Konzentrationsbestimmung der RNA, Unterschiede zwischen den Proben und Pipettierfehler zurückgeführt werden können.

Die Variationen der Standardkurven in der Steigung beträgt ca. 3-4 % und in dem Schnittpunkt mit der Ordinate ca. 3-5 %. Da die Variation in der Standardkurve mit der Variation der Unbekannten korreliert, ist eine Detektion von 2-fachem Unterschied über einen großen Konzentrationsbereich von mindestens vier log-Stufen möglich. Die Steigung der Kalibriergeraden ist reproduzierbarer als der Schnittpunkt mit der Ordinatenachse. Die Standardkurven hatten eine hohe Korrelation von 0.97.

4.1.4 Berechnung der relativen Expression

Für die Berechnung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, in der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ die n-fache Expression zweier Proben untereinander ergibt, wird von der Annahme ausgegangen, dass die PCR mit einer Effizienz von 100 % arbeitet. Eine wahre RTD-PCR hat jedoch unter optimierten Bedingungen eine Effizienz von 1.7 bis 1.9. Daher versuchen effizienzkorrigierte relative Quantifizierungsmodelle dieser Unterschiede gerecht zu werden. Dafür muss die Effizienz genau berechnet werden. Zur Berechnung der effizienzkorrigierten relativen Expression stehen verschiedene Softwares zur Verfügung, die die Bestimmung von einem einzigen Transkriptionsunterschied zwischen einer Kontrolle und einer Probe erlauben (z.B. LightCycler Relative Quantification Software, Q-Gene) oder einen Vergleich mehrere Gruppen durchführen

können (z.B. REST and REST-XL; <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/rest.html>). Diese Softwares wurden in dieser Arbeit aber nicht zum Einsatz gebracht, da der hohe Aufwand die geringen Korrekturen an den Daten in dieser Studie nicht rechtfertigte.

Für die Berechnung der Effizienz wird im iCycler von Biorad die Steigung der Standardkurve herangezogen und mit Hilfe der Formel $\text{Effizienz} = 10^{-1/\text{Steigung}}$ (bei einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit 10 als Basis) berechnet. Für die Berechnung der Standardkurven-Gleichung wird von dem iCycler (Biorad) die maximale Korrelation der Datenpunkte gesucht. Diese Berechnungsmethode kann die Effizienz überschätzen, so dass auch Effizienzen von über 100 % auftreten können, was nicht plausibel ist. Andere mathematische Modelle (z.B. Berechnung anhand des absoluten Fluoreszenzanstiegs, Berechnung anhand eines exponentiellen Berechnungsmodells) kommen zu niedrigeren Effizienzen. Hierdurch kann auch erklärt werden, warum die Berechnung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode fast immer zu höheren Unterschieden in der n-fachen Expression führt, als die Berechnung mit Hilfe einer Standardkurve (Abb. 3.16).

Wird eine bereits errechnete Geradengleichung als Standardkurve für alle weiteren Läufe verwendet, so wie es bei der Software des LightCyclers der Fall ist, hat das den Nachteil, dass Variationen in den Reagenzien, von Tag zu Tag oder Platte zu Platte nicht abgedeckt werden. Da diese die PCR-Effizienz beeinträchtigen, kann dieser Ansatz signifikante Fehler verursachen. In dieser Arbeit wurde daher immer eine Standardkurve auf jeder PCR-Platte mitgemessen.

4.1.5 Regulation von MRP3 und OATP-C bei Patienten mit PBC

Sowohl bei PBC als auch bei PSC ist das Expressionsmuster hepatobiliärer Transporter verändert. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass bei PBC die mRNA von MRP3 auf 46 % \pm 42 % und von OATP-C auf 50 % \pm 32 % herunterreguliert ist. Die umfangreichste Studie zur Transporterexpression bei PBC wurde von Zollner et al.¹¹¹ durchgeführt. Diese Studie zeigt, dass OATP-C im Lebergewebe von Patienten mit PBC Stadium IV auf 64 \pm 72 % auf mRNA-Ebene und auf 56 \pm 22 % auf Protein-Ebene herunterreguliert ist. MRP3 war ebenfalls auf mRNA-Ebene in Stadium IV-PBC-Patientenproben herunterreguliert (65 \pm 35 %, nicht signifikant), der Proteinlevel hingegen war deutlich erhöht (264 \pm 10 %). In einer vorangegangenen Studie von Zollner et al. wurde gezeigt, dass bei chronischer Hepatitis C MRP2, BSEP und OATP-C im Vergleich zu einer Kontrollgruppe unverändert sind¹¹². In einer Studie von Kojima et al.¹¹³ ist die Expression in Leberbiopsien von Patienten mit PBC

(Stadium III) der untersuchten hepatobiliären Aufnahmetransporter (OATP-C, OATP8, NTCP) auf Proteinebene erniedrigt, die der Exportpumpen (u. a. MRP3) gleichbleibend. Ros et al.¹¹⁴ kommen zu der Ansicht, dass MRP3 in Patienten mit PBC in der Immunhistologie hochreguliert erscheint. Diese Daten stimmen gut mit denen in unserer Arbeit erhobenen überein.

Zusammengefasst scheinen in Patienten mit PBC die Aufnahmetransporter (OATP-C, NTCP) reduziert zu sein und die kanalikulären Exportpumpen (BSEP, MRP2) unverändert zu sein. Interessant ist, dass MRP3 auf mRNA-Ebene erniedrigt ist, auf Proteinebene aber erhöht.

4.1.6 Expression hepatobiliärer Transporter bei PSC

In Lebergewebe von PSC-Patienten konnten wir einen Unterschied in der mRNA-Expression feststellen: MRP2, MRP6 und OATP-C waren im Vergleich zu den Kontrollen herunterreguliert, BSEP auf 249 % hochreguliert und MRP1, MRP3 und NTCP blieben unverändert. Im Westernblot konnten wir zeigen, dass MRP2 und OATP-C bei Patienten mit PSC leicht herunterreguliert, BSEP leicht hochreguliert und NTCP unverändert ist.

Im Gegensatz zur PBC gibt es nur wenige Studien zur Transporterexpression bei Patienten mit PSC. In einer Untersuchung von Oswald et al. ist beobachtet worden, dass in Patienten mit PSC die mRNA-Expression von OATP-C auf 49 % und von MRP2 auf 27 % runterreguliert ist²⁸. Im Tiermodell (*Rattus rattus*) einer chronischen Cholangitis konnte von Geier et al. eine verminderte Mrp2-Expression, sowohl im Northernblot, als auch im Westernblot gezeigt werden²⁷. Dass im Gegensatz zu diesen Ergebnissen von uns nur eine leicht verminderte Expression von MRP2 nachgewiesen werden konnte, liesse sich eventuell durch die mittlerweile etablierte Behandlung von PSC-Patienten mit Ursodeoxycholinsäure (UDCA) erklären. UDCA ist ein Hauptbestandteil der Galle des Schwarzen Bären, welche in China als traditionelle Medizin gegen Cholestase angewendet wird. UDCA ist auch zu einem geringen Anteil in der humanen Galle (3 % aller Gallensäuren) vorhanden und wird in steigendem Maße für die Therapie von cholestatischen Erkrankungen, wie z.B. der PBC und PSC eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es unter einer UDCA-Therapie zu einer Induktion von MRP2 kommt.

MDR3 zeigt keinen Unterschied in der Expressionsstärke bei PSC im Westernblot. Für MDR3 konnte in einer Studie von Zollner et al.¹¹¹ bei Patienten mit PBC die doppelte Proteinmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Kojima et al. kommen allerdings zu dem

Ergebnis, dass kein signifikanter Unterschied in der Expression von MDR3 in Patienten mit PBC (Stadium III) zu beobachten ist¹¹³.

Das Expressionsmuster kann nicht allein durch das Vorhandensein einer Cholestase bei PSC erklärt werden, da eine Studie mit Patienten mit entzündungsinduzierten ikterischen Cholestasen (hauptsächlich alkoholische Hepatitis) ein anderes Muster zeigte: NTCP, OATP2 und BSEP mRNA war reduziert auf 41 % ($P < 0.001$), 49 % ($P < 0.005$), und 34 % ($P < 0.05$). NTCP und BSEP waren in der Immunhistologie erniedrigt. Der MRP2 mRNA-Level blieb unverändert, dafür in der Immunfärbung kanalikulär vermindert. MRP3, MDR1, MDR3 und FIC1 waren unverändert¹¹².

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei PSC MRP1, MRP3 und NTCP unverändert bleiben, OATP-C, MRP2 und MRP6 herunterreguliert werden und BSEP hochreguliert wird.

4.1.7 Korrelation von Expressionsstärke und Leberparametern

Zollner et al. haben gezeigt, dass die Expressionsstärke hepatobiliärer Transporter mit der Konzentration der Gallensalze im Serum von PBC-Patienten korrelierbar ist: je höher der Gehalt an Cholinsäure (CA) bzw. Deoxycholinsäure (DCA) ist, desto niedriger ist die OATP-C bzw. MRP2 Expression¹¹¹. UDCA scheint OATP-C und MRP2 hingegen zu induzieren.

Leider standen für die Korrelation mit der Expressionsstärke der Transporter keine Serumproben zur Messung des Gallensalz-Gehaltes zur Verfügung. Die zur Verfügung stehenden Daten (Serum-alkalische Phosphatase, Cholinesterase, γ -Glutamyltransferase und Bilirubin) zeigten keine Korrelation mit der Expressionsstärke der untersuchten Transporter korrelieren.

4.1.8 Regulation hepatischer Transporter

Es stellt sich die Frage, ob eine Veränderung der Funktionalität hepatischer Transporter zur Pathogenese von PSC oder PBC beiträgt. In der Einleitung wurde bereits die Relevanz für Transporterdefekte bei der Entstehung schwerwiegender, cholestatischer Lebererkrankungen diskutiert („Hereditäre cholestatische Erkrankungen“, Seite 9). Um eine mögliche Beteiligung von BSEP oder MDR3 zu untersuchen, wurde von Pauli-Magnus et al. nach Sequenzunterschieden in Patienten mit PSC und PBC im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesucht. Es konnte jedoch kein Allel bzw. Haplotyp mit PBC oder PSC in Verbindung gebracht

werden¹¹⁵. Auch eine Mutation in ABCC2 (MRP2) erscheint unwahrscheinlich, da ein Defekt zum klinischen Bild des Dubin-Johnson Syndroms führt.

Im Gegensatz zu den Exportpumpen ist die Rolle der Aufnahmetransporter in der Pathogenese weniger gut definiert. Obwohl einige Polymorphismen des SLC21A6 (OATP-C) bekannt sind, die ein vermindertes Substratspektrum aufweisen, zeigen die Patienten keinen offensichtlichen Phänotyp. Die natürlich auftretende Mutation SLC21A6-L193R, die zu einer defekten Proteinreifung und damit zu einer fehlenden Transportfunktion *in vitro* führt, zeigt keine klinischen Besonderheiten¹¹⁶. Ausserdem existieren Transporter mit ähnlichem Substratspektrum, die eine fehlende Funktion kompensieren können. Daher ist eine Mutation im SLC21A6-Gen als Ursache der PSC oder PBC unwahrscheinlich.

Da alle untersuchten Transporter bei PBC und PSC exprimiert werden, im Westernblot die korrekte Länge zeigen und, abgesehen von MRP2, in ihren Domänen exprimiert werden, kann höchstens die Transportfunktion durch eine Mutation betroffen sein.

Daher ist es gut möglich, dass die starke Regulation von OATP-C und BSEP einen adaptiven Mechanismus darstellt. Diese Regulation lässt sich mit der durch die Cholestase erhöhten Gallensäuren-Konzentration erklären:

Schlüsselenzyme des Cholesterol- und Gallensäure-Stoffwechsels, Phase I und Phase II Enzymen sowie Transporter für Gallensäuren und Xenobiotika werden teilweise von gleichen nukleären Transkriptionsfaktoren reguliert. Im menschlichen Genom finden sich 48 Mitglieder dieser Protein-Superfamilie, die u.a. die Subfamilie der Orphan Nuclear Receptors umfasst. Von Interesse ist es, dass viele Mitglieder durch Liganden reguliert werden, die in vielen physiologischen Prozessen der Leber involviert sind, einschliesslich Retinoide (RAR), Gallensäuren (FXR), Fettsäuren (PPAR α) und eine Reihe von Pharmaka und Toxinen (CAR, PXR). Orphan Nuclear Receptors binden DNA in der Regel als Heterodimer mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR).

Die Liganden des Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) sind Gallensäuren und deren Taurin-Konjugate, vor allem CDCA, DCA und LCA. FXR reguliert verschiedene Schritte im Gallensäure-Metabolismus: Aufnahme, Synthese und Sekretion. Transportergene, die durch FXR induziert werden, schliessen BSEP, OATP8 und MRP2 mit ein, während Ntcp, OATP-C und mAsbt durch FXR indirekt reprimiert werden. Dieses könnte erklären, warum bei PSC und PBC OATP-C herunterreguliert ist und BSEP verstärkt exprimiert wird.

Das FXR:RXR Heterodimer interagiert auch mit einem hoch konservierten Inverse Repeat-Element (IR1) in der Promotorregion des Proteins Small Heterodimer Partner-1 (SHP-1) und induziert dessen Transkription. SHP-1 supprimiert die Transkription von CYP7A1 (Cholesterol-7 α -Hydroxylase) und CYP8B, zwei wichtigen Enzymen des neutralen Weges der Gallensäure-Synthese, indem es mit dem Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1) interferiert. SHP-1 konkurriert zusätzlich mit dem Retinoid Acid Receptor (RAR)/RXR Heterodimer um dessen Bindungsstelle im Promotor von Ntcp und inhibiert so die Transkription von NTCP. Eine IL6 β vermittelte RXR/RAR Repression von Ntcp scheint JNK-abhängig zu sein¹¹⁷. Es sollte eigentlich erwartet werden, dass NTCP bei cholestatischen Erkrankungen herunterreguliert wird, was in dieser Arbeit aber nicht gezeigt werden konnte.

Zusätzlich stehen intrazelluläre Gallensäure-bindende Proteine, wie z.B. das Liver Fatty Acid-binding Protein (L-FABP) und das Ileal Bile Acid Binding Protein (I-BABP) unter der Kontrolle von FXR. Gene des Lipid Metabolismus (PTLP und apoCII) werden ebenfalls direkt induziert.

OATP-C und MDR1 werden über die Transkriptionsfaktoren PXR und den constitutive Androstane Receptor (CAR), der mit PXR nahe verwandt ist und mit diesem viele Liganden und Funktionen teilt, reguliert¹¹⁸. Die Regulation von MRP2 und MRP3 scheint ebenfalls ein Zusammenspiel von RXR, PXR, FXR und CAR zu sein¹¹⁹. Ausserdem bindet der in der Leber angereicherte Transkriptionsfaktor HNF1 α in der Promotorregion von OATP-C¹²⁰.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die die Expression hepatobiliärer Transporter beeinflussen, sind z.B. HNF3 β , der Retinoid acid Receptor (RAR α ; z.B. Ntcp), der Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α ; z.B. Mdr2) und der Liver X Receptor (LXR α/β ; z.B. ABCA1 und ABCG5/ABCG8).

4.1.9 Expression und Lokalisation von MRP2

In der Immunfluoreszenz-Färbung von MRP2 konnte kein Unterschied in der Expression zur Kontrollgruppe sichtbar gemacht werden. Dieses hat aber insofern eine schwache Aussagekraft, da ein Abschätzen unterschiedlicher Fluoreszenzsignale durch das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe während der Mikroskopie schwierig ist. Die Immunfluoreszenzmikroskopie hat aber den Vorteil, dass sie bei der Bestimmung der Lokalisation schärfer abgrenzt und eine Färbung mehrerer unterschiedlicher Proteine gleichzeitig möglich ist. So konnte in einer von fünf PBC und in vier von zwölf PSC-Proben

eine veränderte, intrazelluläre Lokalisation von MRP2 beobachtet werden. Kojima et al beschreiben dieses Phänomen in Patienten mit PBC (Stadium III)¹¹³. Diese wird begleitet von einer reduzierten Expression von Radixin, ein Protein der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Familie. Die Proteine der ERM Familie verknüpfen Actin-Filamente mit integralen Membranproteinen. Radixin ist essentiell für die apikale Lokalisation von MRP2¹²¹.

Es stellt sich die Frage, ob die veränderte Lokalisation ursächlich für das Krankheitsgeschehen ist, oder ob dieses eine Reaktion auf die physiologischen Bedingungen darstellt.

Grundsätzlich kann die Zelle auf veränderte Milieu-Bedingungen durch Änderung der Transkriptionsrate, der post-transkriptionalen Prozessierung und Stabilität der mRNA, der Translationseffizienz, der intrazellulären Verteilung, der Proteinaktivierung (z.B. durch Phosphorylierung) oder der Proteindegradation reagieren. Die Halbwertszeit für Mdr1, Mdr2 und Bsep in Hepatozyten der Rattenleber ist 5 Tage, weshalb die Regulierung der hepatischen Transporter auf der Ebene der Transkription einen langsamen Mechanismus darstellt. Für eine kurzfristige Regulation steht ein Mechanismus zur Verfügung, bei dem die intrazelluläre Verteilung verändert wird. So wird Ntcp, Bsep und Mrp2 in der Ratte durch das Verschieben zwischen der basolateralen bzw. apikalen Membran und einem intrazellulären Vesikel-Pool reguliert¹²².

Die hepatischen Transporter werden im ER synthetisiert, im Golgi-Apparat prozessiert und in die apikale bzw. basolaterale Membran transloziert. In Vivo Labeling Experimente haben gezeigt, dass Mdr1 und Mdr2 direkt und Bsep über einen intrazellulären Pool in die kanalikuläre Membran inseriert werden, nachdem sie im Golgi prozessiert worden sind. Danach herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Endozytose und Exozytose, bei dem die Transporter zwischen ihrer Domäne und einem intrazellulären Vesikel-Pool verschoben werden. Kanalikuläre Membranproteine, z.B. Mdr1, Mdr2, Mrp2 und Bsep, sind bei Ratten in einem perikanalikulären Pool von Vesikeln vorhanden, die auf Behandlung durch Dibutyryl cAMP durch schnelles Sorting in die apikale Domäne verschwinden. Daher erhöht Dibutyryl cAMP in Ratten die Transportaktivitäten von Mrp2 und Bsep¹²³. Colchicin, welches die Microtubuli zerstört, wirkt dem entgegen, ebenso wie Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)¹²⁴. PI3-Kinasen sind ubiquitäre Kinasen des Phosphoinositols, die Signale von Oberflächenrezeptoren transduzieren und wichtig für Zellproliferation, Adhäsion und Neuordnung des Zytoskeletts sind. Durch Gabe von Produkten der PI3K lässt sich der Effekt von Wortmannin umkehren. Neben cAMP und PI3K

sind auch andere Signal-Transduktionskaskaden beteiligt, z.B. scheinen verschiedene Isoformen der Protein Kinase C (PKC)¹²⁵ und der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK)¹²⁶ eine Rolle bei der Phosphorylierung und Insertion von Mrp2 in Rattenhepatozyten zu spielen.

Einige Substanzen induzieren Cholestase dadurch, dass sie die Verteilung des Mrp2 beeinflussen, z.B. Lipopolysaccharide¹²⁷. Phalloidin, das stark hepatotoxisch wirkende und Cholestase auslösende Gift des Pilzes *Amanita phalloides* verursacht die Translokation von Mrp2 und anderer kanalikulärer Proteine in intrazelluläre Vesikel in Ratten innerhalb von 30 Minuten¹²⁸. 17 β -Glucuronosyl Estradiol (E₂17G) wirkt ähnlich innerhalb von 10 Minuten, aber der Prozess ist reversibel und Mrp2 wird nach zwei Stunden wieder in die kanalikuläre Membran inseriert¹²⁹. Diese Vorgänge können also scheinbar in wenigen Minuten stattfinden. Durch Ursodeoxycholsäure (UDCA) werden Bsep und Mrp2 über Ca²⁺- und PKC- α -abhängige Mechanismen und/oder Aktivierung von p38^{MAPK} und extrazellulärer Signal-regulierter Kinasen (Erk) in die Membran befördert¹³⁰.

Der Verdacht liegt nahe, dass die in einigen PBC und PSC-Patienten beobachtete intrazelluläre Verteilung von MRP2 eher eine Folge als eine Ursache darstellt. Hierfür spricht, dass nicht jeder Patient diese veränderte Lokalisation von MRP2 zeigte und dass immer auch kanalikulär lokalisiertes MRP2 nachweisbar war. Eine Störung innerhalb der beschriebenen Regulationsmechanismen bleibt aber durchaus denkbar.

4.1.10 Regulation der Transporterexpression durch Sirolimus

Die Expression von MRP2, MRP3, MRP6 und NTCP in HepG2-Zellen, die entweder mit oder ohne 5 μ M Sirolimus (SRL) inkubiert worden waren, wurde mit Hilfe der RTD-PCR verglichen. ACTB wurde zur Normalisierung der Proben verwendet. Die Zellkultur ermöglichte den Einsatz gleicher Mengen RNA, indem die Zellen für die Isolierung direkt in den Wells lysiert wurden.

Es zeigte sich, dass HepG2-Zellen unter der Behandlung von SRL NTCP und MRP6 auf mRNA-Ebene leicht, aber nicht signifikant, herunterreguliert wird, MRP2 etwas und MRP3 um ca. das vierfache hochreguliert wird.

Im Tiermodell von Bramow et al. konnte gezeigt werden, dass SRL und CsA in Kombination, nicht aber allein, Mdr2 und Oatp2 induzieren und Mrp2 vermindern. Ntcp, Oatp1, Bsep und Mdr1b blieben unverändert. Mrp3 wurde in der Studie nicht untersucht. Cyp3a9, Cyp1a2 und

Cyp2e1 blieben ebenfalls unverändert³⁷. Auch das humane MDR1 wird durch CsA, nicht aber TRL, induziert¹³¹.

Es ist gut möglich, dass eine Induktion oder Hemmung der Transportertranskription durch nukleäre Rezeptoren vermittelt wird. Da die Regulation von MRP3 von RXR, PXR, FXR und CAR mit beeinflusst wird, wären diese Transkriptionsfaktoren gute Kandidaten für weitere Untersuchungen. So könnte eine Bindung von SRL an FXR MRP3 und MRP2 hochregulieren und NTCP herunterregulieren, was den Versuchsergebnissen entspricht.

Auch andere Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren hepatobiliärer Transporter könnten beteiligt sein, z.B. der Pregnane X Receptor (PXR). PXR ist ein vielseitiger Sensor für Xenobiotika und wird aktiviert durch verschiedene strukturell nicht verwandte Moleküle wie z.B. Steroide, Xenobiotika und Pharmaka, aber auch durch Gallensäuren (z.B. LCA, UDCA). Er reguliert Mitglieder der Cytochrom P450 Familie und Transporter (z.B. MDR1)¹³². PXR induziert vor allem die Subfamilie CYP3A der Monooxygenasen, die ca. 30 % aller hepatischen CYPs ausmacht und die Oxidation von über 60 % (CYP3A4 allein 50 %) aller verschriebenen Medikamente katalysiert. Durch diesen Mechanismus der CYP3A-Induktion lassen sich viele Medikamenten-Interaktionen erklären. Eine Induktion von CYP3A4 durch Phenytoin oder eine Inhibition durch Ketoconazol z.B. verändert die Clearance von Substraten, zu denen auch Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus zählen. Ein weiterer Hinweis ist, dass SRL und CsA, nicht aber RAD, MDR1 in endothelialen Zelllinien induzieren¹³³.

Weitere Untersuchungen, ob SRL ein Ligand einer der Transkriptionsfaktoren ist, wären von großem Interesse. Eine indirekte Induktion von MRP3 durch einen anderen Mechanismus ist aufgrund der vielfältigen Wirkmechanismen von SRL aber auch denkbar.

Interessant ist auch, dass die Lokalisation von rBsep in der kanalikulären Membran durch CsA, nicht aber durch TRL vermindert wird und es zu einer Zerstörung des perikanalikulären F-Actin Zytoskelettes kommt¹³⁴. So könnte der beobachtete Effekt von SRL auch durch Störung des kanalikulären Exportes zu einer Induktion von MRP3, ähnlich der unter cholestatischen Bedingungen beobachteten, kommen.

4.2 Transportstudien mit transfizierten Zelllinien

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden, um die intestinale Permeabilität von Pharmaka einschätzen zu können, sind *in vitro* Versuche mit Caco-2 humanen Kolon-Adenokarzinomzellen neben anderen Zelllinien, z.B. MDCKII Zellen. Die Kenntnis über das Transporter-Expressionsprofil für die Bewertung von Transportstudien ist dabei von großer Bedeutung.

Der Transport vieler Substanzen durch Caco-2 Zellen wird durch die Existenz von MDR1 erklärt, da MDR1 von Caco-2 Zellen stark exprimiert wird. Neben MDR1 liessen sich in der RT-PCR zusätzlich auch MRP1 bis MRP6 und NTCP nachweisen. Im Westernblot konnte die Expression von MRP1 und MRP2 bestätigt werden. Da MRP1 und MRP2 eine Vielzahl an Substraten transportieren, ist es durchaus denkbar, dass diese Transporter eine Rolle bei dem Transport von Immunsuppressiva spielen.

Für MDCKII-Zellen konnte eine relativ starke MDR1-Expression festgestellt werden. Bereits Goh et al. wiesen darauf hin, dass MDCKII-Zellen, verglichen mit MDCK oder LLC-PK1-Zellen, relativ viel MDR1 exprimieren. Zusätzlich exprimieren MDCK und MDCKII Zellen MRP1 und MRP2¹³⁵. Dieses führt bei Transportstudien in MDCKII Zellen zu einem hohen Hintergrundsignal: der Transport von CsA von basal nach apikal ist in den Wildtyp-Zellen dreimal stärker als von basal nach apikal. In ihrem Vergleich von MDCK, MDCKII und LLC-PK1 Zellen kamen Goh et al. zu dem Ergebnis, dass LLC-PK1 Zellen aufgrund der geringen bzw. nicht vorhandenen Expression von MDR1, MRP1, MRP2, OATP-A und OATP-C am besten für Transportstudien geeignet seien. Diese Zellen standen in dieser Studie aber nicht zur Verfügung.

In dieser Arbeit konnten eine schwache Expression von MRP2 und MDR1 im MDCKII-Wildtyp nachgewiesen werden. Während MRP2 kaum im Westernblot nachzuweisen ist, ist der Unterschied zwischen Wildtyp und überexprimierenden Zellen bei MDR1 scheinbar gering (Abb. 3.34 und 3.36). Trotzdem ergibt sich ein deutlicher Unterschied zwischen WT Zellen und MDR1-überexprimierenden Zellen (Abb. 3.43).

Mrp3 scheint relativ stark in den Wildtypzellen exprimiert zu werden, während das humane MRP3 deutlich kürzer im Westernblot läuft. Ob die Bande in den Wildtypzellen wirklich das

canine Homolog des MRP3 ist, bleibt ungeklärt. Sollte dieses so sein, ist die Bewertung des Transportes fraglich.

Zur Zeit sind für *Canis familiaris* von den untersuchten Transportern nur die Sequenzen für MDR1, MRP1 und MRP2 veröffentlicht. Daher sind die Ergebnisse für die anderen untersuchten Transporter mit Vorsicht zu betrachten. Die PCR-Produkte für MRP4 und MRP5 liefen zumindest bei der erwarteten Länge, so dass von exprimierten Homologen für MRP4 und MRP5 im Hund ausgegangen werden kann. Das Substratspektrum für MRP4 und MRP5 ist wenig bekannt, ihre Rolle in der Physiologie noch unklar. Auch für MRP1 und MRP2 wurden dieselben Primerpaare verwendet, wie für die humanen Homologe. Alle Primer für MRP1 und MRP2 haben deshalb Mismatches, trotzdem scheint die PCR für MRP2 zu funktionieren, im Gegensatz zu MRP1, dessen Reverse-Primer einen Mismatch ungünstigerweise am 3'-Ende trägt und deshalb wohl ein falsch-negatives Ergebnis liefert, denn in der Literatur wird eine Expression des MRP1 bestätigt.

Für Studien an BSEP und OATP-C könnten Huh7 Zellen verwendet werden; diese exprimieren BSEP, NTCP und OATP-C.

4.2.1 Transepitheliale Resistenz (TEER)

Die Integrität von Monolayern im Transwell wird in den meisten Studien durch parallele Messung nicht-membrangängiger Substanzen (z.B. Mannitol), mikroskopische Überprüfung und der Messung der transepithelialen Resistenz (TEER) bewertet. Das Messen der TEER hat einen geringeren Arbeitsaufwand als das parallele Messen nicht membrangängiger Substanzen und bietet eine höhere Sicherheit als die mikroskopische Kontrolle allein.

Die in der Literatur angegebenen TEER-Werte für die einzelnen Zelllinien schwanken stark, was an einer uneinheitlichen Berechnung, der Verwendung unterschiedlicher Geräte, Transwell-Systeme und Substanzen oder der Anwendung verschiedener Protokolle liegen mag. Die in dieser Arbeit gemessenen TEER-Werte entsprechen aber in ihren Tendenzen denen in der Literatur veröffentlichten¹³⁶.

Wird der Monolayer auf einem Transwell mit der Pipettenspitze stark angekratzt, so fällt die TEER von MDCKII-MDR1 Zellen von ca. $200 \Omega\text{cm}^2$ auf ca. $25 \Omega\text{cm}^2$. Nicht so eindeutig fällt die Messung bei einem kleineren Schaden des Monolayers aus. Bei einem einzigen, 2-3 mm langen Kratzer mit der Pipettenspitze in der Nähe eines der drei möglichen Zugänge zur Messung fällt die durchschnittliche TEER nur um $105 \Omega\text{cm}^2$ auf ca. $95 \Omega\text{cm}^2$. Die Messungen

in den drei Zugangsstellen des Transwells unterschieden sich deutlich: 110, 105 und 70 Ωcm^2 . Bei der niedrigsten Messung befand sich der Kratzer. Eine Schwäche der TEER-Messung liegt also in der geringen elektromagnetischen Feldgröße, die von der STX-2 Elektrode abgedeckt wird.

Eine andere Schwäche ist, dass die TEER temperaturabhängig ist. Im Allgemeinen führt eine Temperaturerhöhung bei Metallen zu einer Erhöhung des Widerstandes, bei Elektrolyten und Halbleitern sinkt er. Da das Kulturmedium einem Elektrolyt entspricht, werden bei höheren Temperaturen niedrigere TEER-Werte gemessen (Abb. 3.40). Die Messung wird bei Raumtemperatur durchgeführt, die Zellen aber bei 37°C inkubiert, so dass die Temperatur des Mediums mit der Dauer der Messung abfällt und der TEER-Wert ansteigt. Für reproduzierbare TEER-Werte müssen die Kulturen immer bei gleicher Temperatur gemessen werden, z.B. nachdem sie einige Minuten bei RT inkubiert wurden.

Wie in der Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, bestanden die Zelllayer aus nur einer Zellschicht (Abb. 3.36). Die Ausbildung von Tight Junctions, und damit ein verminderter parazellulärer Fluss, konnte durch die Färbung des Tight Junction Proteins ZO-1 in allen verwendeten Zelllinien gezeigt werden. Die Ausbildung der Tight Junctions ist zusätzlich wichtig für die Polarität der Zellen.

Der TEER-Wert von MDCKII Zellen steigt schnell und erreicht ein Maximum nach zwei Tagen. Danach fällt die TEER wieder etwas ab und erreicht einen konstanten Wert. Dieser Abfall ist mit der Installation von Kanälen in die Plasmamembran assoziiert worden¹³⁷. Ein Vorteil der MDCKII-Zellen gegenüber Caco-2 Zellen ist, dass MDCKII Zellen bereits nach drei Tagen im Gegensatz zu 21 Tagen Kulturdauer verwendet werden können.

4.2.2 Messungen mit der SPE-HPLC-MS/MS

Für die Messung des Transportes muss eine sensitive Detektionsmethode angewendet werden. Die SPE-HPLC-MS/MS zeigte sich als geeignetes Verfahren zur Bestimmung von CsA, TRL, SRL und RAD in Zellkultur-Überständen.

Die untere Grenze der Quantifizierung (10 ng/ml für CsA und 1 ng/ml für TRL, SRL und RAD) liegt bei dieser Methode unter der zu messenden Menge. Bei 5 μM in der Donorkammer befinden sich nach 30 Minuten bei Transport in MDR1 überexprimierenden Zellen von apikal nach basal ungefähr 10-40 ng/ml CsA, TRL, SRL bzw. RAD in der unteren Kammern. Mit

standardisierten Versuchsbedingungen wurde eine geringe Standardabweichung der Messpunkte (Abb. 3.43) und eine gute Reproduzierbarkeit der P_{app} -Werte erreicht.

Es wird ausschliesslich die Muttersubstanz gemessen, nicht aber deren Metabolite. In Studien, die mit radioaktiv markierten Substanzen arbeiten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Metabolit, nicht aber die Substanz selber transportiert wird. So könnte z.B. eine Konjugation mit Glucuronid oder Glutathion die Substanz zu einem Substrat von MRP2 machen.

4.2.3 Transport von Immunsuppressiva durch Monolayer

Der Transport von Ciclosporin (CsA), Tacrolimus (TRL), Sirolimus (SRL) und Everolimus (RAD) durch MDR1, MRP1, MRP2 und MRP3 überexprimierende Zelllinien hindurch wurde im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Für die Bewertung des Transportes wurde der Permeabilitätskoeffizient P_{app} errechnet. Der P_{app} -Wert wird verwendet, um Transporte im zwei-Kammer System (Transwell) zu quantifizieren.

Wenn für die Berechnung des P_{app} -Wertes die Geradengleichungen der Regressionsgeraden berechnet werden, fällt auf, dass die Gerade die Ordinate immer im negativen Bereich schneidet und dementsprechend die Abszissenachse nicht bei null Minuten, sondern erst nach einer Zeitspanne schneidet. Für den Transport basal nach apikal ist dieses noch stärker der Fall. Daher könnte angenommen werden, dass diese Werte die Zeit widerspiegeln, die das Medikament benötigt, um sich in die Zelle und durch die Zelle hindurch zu bewegen.

Der P_{app} -Wert ist in der Regel bis zu einer bestimmten Menge nicht von der Konzentration abhängig. Braun et al.¹³⁸ haben für 14 verschiedene Substanzen in einem Bereich von 10 nM bis 6 μ M eine Unabhängigkeit des P_{app} -Wertes von der eingesetzten Konzentration in MDCKII Zellen festgestellt. Für SRL wird allerdings von verschiedenen Autoren eine Konzentrationsabhängigkeit beschrieben.

Die Permeabilität von Medikamenten lässt sich gut mit der oralen Absorption korrelieren: in Caco-2 Monolayern hatten Medikamente, die komplett absorbiert wurden, einen P_{app} von $< 1 \cdot 10^{-6}$ cm/s und Medikamente mit einer oralen Absorption von 1 - 100 % hatten einen P_{app} zwischen 0.1 und $1 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Caco-2 Zellen erwiesen sich in vielen Studien als gutes in vitro Modell oraler Absorption. Es wurde vorgeschlagen, Medikamente mit einem P_{app} von $< 1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $< 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s und $> 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s in schwach (0 - 20 %), moderat (20 - 70 %) und gut (70 - 100 %) absorbierbare Stoffe zu unterscheiden.

Mannitol, eine Substanz, die zur Bestimmung der Membranintegrität verwendet wird, wurde bei MDCKII Zellen ein P_{app} von $4 \cdot 10^{-7}$ cm/s, in Caco-2 Zellen von $2.4 \cdot 10^{-7}$ cm/s beschrieben.

Interessanterweise wird in der Regel für Mannitol in transfizierten Zelllinien eine höhere Permeabilität gemessen, trotz höherer TEER-Werte.

4.2.4 Transport durch MDR1

Werden die P_{app} -Werte von CsA, SRL, TRL und RAD in MDCKII-WT Zellen miteinander verglichen, wird deutlich, dass der Transport von basal nach apikal deutlich stärker ist als von apikal nach basal (Abb. 3.42 und 3.43). Dieser gerichtete, vermutlich aktive Transport könnte durch das apikal exprimierte canine Homolog des MDR1-Proteins zustande kommen: sowohl in der RT-PCR, als auch in der Immunhistologie und dem Westernblot zeigte sich eine schwache Expression dieses Proteins in der Wildtyp-Variante. Dass CsA, SRL und TRL Substrate des MDR1 sind, verstärkt den Verdacht. Auch der Transport von RAD und SRL wird durch CsA, ein oft verwendeter MDR1-Inhibitor, deutlich gehemmt. Andererseits wird der Transport von SRL nur wenig durch CsA im Wildtyp, aber auch in MDR1 überexprimierenden Zellen, gehemmt.

Alle untersuchten Substanzen sind Substrate des MDR1, da sie in MDCKII-MDR1 Zellen deutlich stärker transportiert werden. Werden die P_{app} -Werte miteinander verglichen, wird SRL von MDR1 Zellen am schnellsten transportiert, gefolgt von RAD und CsA. Die Transportrate in MDR1-Zellen ist allerdings für RAD am höchsten, gefolgt von CsA und SRL. Der Transport von CsA lässt sich durch SRL und RAD hemmen, der von SRL und RAD durch CsA. Der P_{app} -Wert von CsA wird nur in MDR1 Zellen durch SRL oder RAD erniedrigt, wobei SRL ein wenig stärker wirkt. Der Transport von RAD lässt sich stärker durch CsA hemmen, als der Transport von SRL, wobei die erreichte Differenz der P_{app} -Werte aus der Substanz allein zur Kombination in WT und MDR1 Zellen ungefähr gleich stark ist (Abb. 3.44).

Ein Vergleich der Permeabilität für 55 verschiedene Substanzen in MDCK und Caco-2 Zellen ergab ähnliche Werte für absorbierte Substanzen¹³⁹. Wenn also nach der oben erwähnten Klassifikation die orale Bioverfügbarkeit der untersuchten Substanzen bewertet werden soll, dann haben alle Substanzen eine schwache orale Bioverfügbarkeit bis 20 %, was den realen Werten entspricht: die Bioverfügbarkeiten von CsA, TRL, SRL und RAD sind niedrig (27 %, 25 %, 10 % und 16 %).

In Tabelle 4.1 sind die ermittelten Werte für den Transport in MDCKII-Zellen mit in der Literatur veröffentlichten Werten zusammengestellt. Veröffentlichte P_{app} -Werte miteinander zu

vergleichen sollte allerdings mit Vorsicht geschehen, da sich z.B. allein durch die Verwendung von Transwells unterschiedlicher Hersteller die Werte stark unterscheiden können. Auch der experimentelle Aufbau beeinflusst den P_{app} -Wert, z.B. kann durch Verwendung eines Wipptisches die Transportrate deutlich erhöht werden. Ausserdem kann die Expression der gewünschten Transporter in gleichen Zelllinien zwischen den Laboratorien sehr verschieden sein, gerade wenn sehr unterschiedliche Passagen-Nummern verwendet werden.

Wenn aber standardisierte Versuchsbedingungen geschaffen wurden, sind die P_{app} -Werte innerhalb des Labors gut reproduzierbar.

	eingesetzte Menge (μM)	Zelllinie	P_{app} AtoB ($\cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$)	P_{app} BtoA ($\cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$)	Literatur
RAD	5.0	MDCKII	4.7	18.1	-
	0.2	Caco-2	1.6*	33.5*	Crowe et al. ³⁸
	1.0		2.0*	45.0*/24.8 ⁺	
SRL	5.0	MDCKII	4.9	19.4	-
	0.2	Caco-2	0.1*	43.5*	Crowe et al.
	1.0		2.2*	39.0*/12.6 ⁺	
	5.0		8.6*	19*	
	8	Caco-2	1.0		Paine et al. ¹⁴⁰
	25		2.3		
CsA	5.0	MDCKII	4.7	15.0	-
	1.0	Caco-2	0.9*	20.5*/21.4 ⁺	Crowe et al.
	?	LLC-PK1		2.6	Schwab et al. ¹⁴¹
TRL	5.0	MDCKII	8.4	24.9	-

Tabelle 4.1: Ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten P_{app} -Werte mit in der Literatur veröffentlichten Permeabilitätskoeffizienten. *= Die Werte werden von Crowe et al. als effektive Permeabilität (P_{eff}) angegeben; ⁺= Werte für in situ intestinale Perfusion mit Rattendärmen.

Schwab et al. nennen in ihrer Studie für CsA in LLC-PK1 Zellen einen Permeabilitätskoeffizienten von basal nach apikal von $2.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ und eine Ratio von 1.3 im Wildtyp zu 10.2 in MDR1 überexprimierenden Zellen. Der in unserer Arbeit ermittelte

Permeabilitätskoeffizient für CsA in MDCKII-WT Zellen von basal nach apikal beträgt $10.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s und die Rate im Wildtyp 3.2 zu 18.8 in MDCKII-MDR1 Zellen.

Der P_{app} -Wert von SRL in MDCKII-WT Zellen von apikal nach basal betrug $4.9 \cdot 10^{-6}$ cm/s. In einer Studie von Paine et al. wird beschrieben, dass der P_{app} -Wert von SRL in Caco-2 Zellen konzentrationsabhängig ist: bei 8 μ M SRL betrug er von apikal nach basal $9.7 \cdot 10^{-7}$ cm/s, bei 25 μ M $2.3 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Auch Crowe et al. beschreiben eine Konzentrationsabhängigkeit von SRL in Caco-2 Zellen. Statt des P_{app} -Wertes präsentieren die Autoren die korrigierte effiziente Permeabilität (P_{eff}), die bei 0.2 μ M SRL mit $0.1 \cdot 10^{-6}$ cm/s und bei 5 μ M mit $8.6 \cdot 10^{-6}$ cm/s angegeben wird.

Crowe et al. beschreiben keine Konzentrationsabhängigkeit für RAD bei 0.2 und 1.0 μ M in der apikalen nach basalen Richtung in Caco-2 Zellen, die für RAD zwischen 1.6 und $2.0 \cdot 10^{-6}$ cm/s liegt.

Ein weiterer Aspekt, der in Transportstudien mit bedacht werden muss, ist die Expression von Mitgliedern der Cytochrom P450 Familie in MDCKII und Caco-2 Zellen. Die wichtigste Isoform, CYP3A4, wird in MDCKII stark und in Caco-2 schwach exprimiert. Da CsA, SRL und TRL Substrate des CYP3A4 sind, könnten die niedrigeren P_{app} -Werte in MDCKII Zellen im Gegensatz zu Caco-2 Zellen durch stärkere Metabolisierung der Substanzen erklärt werden.

4.2.5 Berechnung von V_{max} und K_m

Für CsA wurde im Transwell-System die V_{max} und K_m berechnet. Der K_m -Wert beträgt 27 μ M, die V_{max} ca. 17 nmol/cm²/h. Diese Werte stimmen ungefähr mit denen von Saeki et al. ermittelten Werten überein. In Membranvesikeln aus LLC-PK1 Zellen, die mit MDR1 transfiziert worden waren, wurde die Michaelis Konstante mit 8.4 μ M und die V_{max} mit 2.4 nmol/mg Protein/h ermittelt¹⁴². Das zeigt, dass im Transwell System durchaus K_m und V_{max} ermittelt werden können; allerdings ist der Materialaufwand sehr hoch, und der Versuch ist arbeitsintensiver als andere Methoden.

4.2.6 Transport durch MRP1-Zellen

Der Transport von jeweils 5 μM CsA, TRL, SRL und RAD wurde in MRP1-überexprimierenden MDCKII Zellen untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Die Permeabilität von CsA und SRL unterschieden sich zwischen Wildtyp und MRP1 Zellen: die Netto Permeabilität war geringer in MRP1 überexprimierenden Zellen gegenüber den Wildtyp Zellen. Der Transport von TRL und RAD blieb unverändert. Da MRP1 basal exprimiert wird, lässt dieses auf einen Transport von CsA und SRL durch MRP1 schliessen.

Von Leier et al. konnte gezeigt werden, dass MK571, CsA und PSC833 den Transport von LTC₄ durch MRP1 überexprimierende Zellen inhibiert¹⁴³. Dieser Mechanismus könnte, ähnlich der Hemmung des MDR1, eine kompetitive Hemmung sein, was bedeuten würde, dass CsA ein Substrat des MRP1 wäre. Crowe et al. erwähnen, dass die Inkubation von Caco-2 Zellen mit Probenecid, einem Inhibitor des basal exprimierten MRP1, den Transport von SRL deutlich verändert. Die Permeabilität von CsA und RAD blieben aber unverändert³⁸.

Die Ergebnisse dieser beiden Arbeitsgruppen unterstützen die These, dass CsA und SRL Substrate von MRP1 sind. Da MRP1 auf niedrigem Level ubiquitär exprimiert wird, mit etwas höheren Mengen in Lunge und Niere, könnte MRP1 eine Rolle in der Bioverfügbarkeit von SRL und CsA spielen. Allerdings sollte diese These durch andere Experimente, z.B. Aufnahme der Substanzen in Membranvesikel, unterstützt werden.

4.2.7 Transport durch MRP2 und MRP3

Die Funktionalität der MRP2 Zellen ist mehrfach bestätigt worden, sowohl durch RT-PCR, Westernblot und Immunhistologie, als auch durch persönliche Kommunikation mit Dr. Steffen Baltes (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover), der die gleiche Charge bzw. Passage verwendete und den Transport von bekannten Substraten des MRP2 bestätigte. Daher war es nicht nötig, eine Positivkontrolle mitlaufen zu lassen. CsA, TRL und SRL sind keine Substrate des MRP2, da kein signifikanter Unterschied in den P_{app} -Werten oder des Transportverhältnisses feststellbar war. Wie schon erwähnt, wurde nur die Muttersubstanz gemessen, daher bleibt es offen, ob MRP2 am Transport von Metaboliten der untersuchten Substanzen und somit an der Elimination in die Galle beteiligt ist. Durch MRP3 konnte ebenfalls kein Transport der Substanzen nachgewiesen werden. Da aber die Funktionalität der MDCKII-MRP3 Zellen nicht bestätigt ist, bzw. der Wildtyp ebenfalls MRP3 zu exprimieren scheint, ist ein Transport nicht ausgeschlossen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Muller, M. & Jansen, P.L. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol* **272**, G1285-G1303 (1997).
2. Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., & Deeley, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654 (1992).
3. Cole, S.P., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C.E., Wilson, G.M., & Deeley, R.G. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* **54**, 5902-5910 (1994).
4. Kuipers, F., Enserink, M., Havinga, R., Van Der Steen, A. B. M., Hardonk, M. J., Fevery, J., and Vonk, R. J. Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. *J.Clin.Invest* **81**, 1593-1599. 1988.
5. Jansen, P. L., Peters, W. H. M., and Lamers, W. H. Hereditary conjugated hyperbilirubinaemia in mutant rats caused by defective hepatic anion excretion. *Hepatology* **5**, 573-579. 1985.
6. Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume, K., Shimizu, T., & Sugiyama, Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol* **272**, G16-G22 (1997).
7. Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I., & Keppler, D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **55**, 929-937 (1999).
8. Kawabe, T., Chen, Z.S., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S., & Kuwano, M. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* **456**, 327-331 (1999).
9. Kool, M., van der, L.M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith, A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F., & Borst, P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6914-6919 (1999).
10. Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., & Keppler, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 377-394 (1999).
11. Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G.E., Welker, E., Szabo, K., de Haas, M., Van Deemter, L., Borst, P., Varadi, A., & Sarkadi, B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 32167-32175 (1998).
12. Hagenbuch, B. & Dawson, P. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* (2003).
13. Hagenbuch, B. & Meier, P.J. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest* **93**, 1326-1331 (1994).
14. Hagenbuch, B. & Meier, P.J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* 1-8 (2003).

15. Hagenbuch,B. & Meier,P.J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, 1-18 (2003).
16. König,J., Cui, Y., Nies,A.T., & Keppler,D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **278**, G156-G164 (2000).
17. Kullak-Ublick,G.A., Ismail,M.G., Stieger,B., Landmann,L., Huber,R., Pizzagalli,F., Fattinger,K., Meier,P.J., & Hagenbuch,B. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**, 525-533 (2001).
18. Carlton,V.E., Knisely,A.S., & Freimer,N.B. Mapping of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease) to 18q21-q22, the benign recurrent intrahepatic cholestasis region. *Hum Mol Genet* **4**, 1049-1053 (1995).
19. Strautnieks,S.S., Bull,L.N., Knisely,A.S., Kocoshis,S.A., Dahl,N., Arnell,H., Sokal,E., Dahan,K., Childs,S., Ling,V., Tanner,M.S., Kagalwalla,A.F., Nemeth,A., Pawlowska,J., Baker,A., Mieli-Vergani,G., Freimer,N.B., Gardiner,R.M., & Thompson,R.J. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* **20**, 233-238 (1998).
20. Deleuze,J.F., Jacquemin,E., Dubuisson,C., Cresteil,D., Dumont,M., Erlinger,S., Bernard,O., & Hadchouel,M. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **23**, 904-908 (1996).
21. de Vree,J.M., Jacquemin,E., Sturm,E., Cresteil,D., Bosma,P.J., Aten,J., Deleuze,J.F., Desrochers,M., Burdelski,M., Bernard,O., Oude Elferink,R.P., & Hadchouel,M. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 282-287 (1998).
22. Lucena,J.F., Herrero,J.I., Quiroga,J., Sangro,B., Garcia-Foncillas,J., Zabalegui,N., Sola,J., Herraiz,M., Medina,J.F., & Prieto,J. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **124**, 1037-1042 (2003).
23. Paulusma,C.C., Bosma,P.J., Zaman,G.J., Bakker,C.T., Otter,M., Scheffer,G.L., Scheper,R.J., Borst,P., & Oude Elferink,R.P. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-1128 (1996).
24. Wada,M., Toh,S., Taniguchi,K., Nakamura,T., Uchiumi,T., Kohno,K., Yoshida,I., Kimura,A., Sakisaka,S., Adachi,Y., & Kuwano,M. Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 203-207 (1998).
25. Girodon,E., Sternberg,D., Chazouilleres,O., Cazeneuve,C., Huot,D., Calmus,Y., Poupon,R., Goossens,M., & Housset,C. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene defects in patients with primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* **37**, 192-197 (2002).
26. Sheth,S., Shea,J.C., Bishop,M.D., Chopra,S., Regan,M.M., Malmberg,E., Walker,C., Ricci,R., Tsui,L.C., Durie,P.R., Zielenski,J., & Freedman,S.D. Increased prevalence of CFTR mutations and variants and decreased chloride secretion in primary sclerosing cholangitis. *Hum. Genet.* **113**, 286-292 (2003).
27. Geier,A., Dietrich,C.G., Lammert,F., Orth,T., Mayet,W.J., Matern,S., & Garton,C. Regulation of organic anion transporters in a new rat model of acute and chronic cholangitis resembling human primary sclerosing cholangitis. *J. Hepatol.* **36**, 718-724 (2002).
28. Oswald,M., Kullak-Ublick,G.A., Paumgartner,G., & Beuers,U. Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* **21**, 247-253 (2001).

29. Goto,T., Kino,T., Hatanaka,H., Nishiyama,M., Okuhara,M., Kohsaka,M., Aoki,H., & Imanaka,H. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant. Proc.* **19**, 4-8 (1987).
30. First International Congress on FK 506. August 21-24, 1991, Pittsburgh, PA. *Transplant. Proc.* **23**, 2709-3380 (1991).
31. Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815. 1991.
32. Schreiber,S.L. & Crabtree,G.R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**, 136-142 (1992).
33. Singh,K., Sun,S., & Vezina,C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *J. Antibiot. (Tokyo)* **32**, 630-645 (1979).
34. Floren,L.C., Bekersky,I., Benet,L.Z., Mekki,Q., Dressler,D., Lee,J.W., Roberts,J.P., & Hebert,M.F. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.* **62**, 41-49 (1997).
35. Wachter,V.J., Silverman,J.A., Wong,S., Tran-Tau,P., Chan,A.O., Chai,A., Yu,X.Q., O'Mahony,D., & Ramtoola,Z. Sirolimus oral absorption in rats is increased by ketoconazole but is not affected by D-alpha-tocopheryl poly(ethylene glycol 1000) succinate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 308-313 (2002).
36. Bohme,M., Muller,M., Leier,I., Jedlitschky,G., & Keppler,D. Cholestasis caused by inhibition of the adenosine triphosphate-dependent bile salt transport in rat liver. *Gastroenterology* **107**, 255-265 (1994).
37. Bramow,S., Ott,P., Thomsen,N.F., Bangert,K., Tygstrup,N., & Dalhoff,K. Cholestasis and regulation of genes related to drug metabolism and biliary transport in rat liver following treatment with cyclosporine A and sirolimus (Rapamycin). *Pharmacol. Toxicol.* **89**, 133-139 (2001).
38. Crowe,A. & Lemaire,M. In vitro and in situ absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: comparison with rapamycin. *Pharm. Res.* **15**, 1666-1672 (1998).
39. Aden,D.P., Fogel,A., Plotkin,S., Damjanov,I., & Knowles,B.B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**, 615-616 (1979).
40. Kullak-Ublick,G.A., Beuers,U., & Paumgartner,G. Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Hepatology* **23**, 1053-1060 (1996).
41. Fogh,J., Wright,W.C., & Loveless,J.D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 209-214 (1977).
42. Fogh,J., Fogh,J.M., & Orfeo,T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221-226 (1977).
43. Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug. Del. Rev.* **22**, 67-84. 1996.
44. Meunier,V., Bourrie,M., Berger,Y., & Fabre,G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **11**, 187-194 (1995).
45. Schmiedlin-Ren,P., Thummel,K.E., Fisher,J.M., Paine,M.F., Lown,K.S., & Watkins,P.B. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol. Pharmacol.* **51**, 741-754 (1997).

46. Hosoya,K.I., Kim,K.J., & Lee,V.H. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* **13**, 885-890 (1996).
47. Hirohashi,T., Suzuki,H., Chu,X.Y., Tamai,I., Tsuji,A., & Sugiyama,Y. Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 265-270 (2000).
48. Louvard,D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 4132-4136 (1980).
49. Richardson, J. C. W., Scalera, V., and Simmons, N. L. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim.Biophys.Acta* 673, 26-36. 1981.
50. Taipalensuu,J., Tornblom,H., Lindberg,G., Einarsson,C., Sjoqvist,F., Melhus,H., Garberg,P., Sjostrom,B., Lundgren,B., & Artursson,P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 164-170 (2001).
51. Chomczynski,P. & Sacchi,N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
52. Mueller,O., Hahnenberger,K., Dittmann,M., Yee,H., Dubrow,R., Nagle,R., & Ilsley,D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* **21**, 128-134 (2000).
53. Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., & Erlich,H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
54. Don,R.H., Cox,P.T., Wainwright,B.J., Baker,K., & Mattick,J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4008 (1991).
55. Kotewicz,M.L., D'Alessio,J.M., Driftmier,K.M., Blodgett,K.P., & Gerard,G.F. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli. *Gene* **35**, 249-258 (1985).
56. Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., & Griffith,R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)* **10**, 413-417 (1992).
57. Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., & Watson,R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)* **11**, 1026-1030 (1993).
58. Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., & Gelfand,D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7276-7280 (1991).
59. Cardullo,R.A., Agrawal,S., Flores,C., Zamecnik,P.C., & Wolf,D.E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 8790-8794 (1988).
60. Livak,K.J., Flood,S.J., Marmaro,J., Giusti,W., & Deetz,K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**, 357-362 (1995).
61. Whitcombe,D., Theaker,J., Guy,S.P., Brown,T., & Little,S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **17**, 804-807 (1999).

-
62. Heid,C.A., Stevens,J., Livak,K.J., & Williams,P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986-994 (1996).
 63. Förster,T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* **2**, 55-75 (1948).
 64. Stryer,L. & Haugland,R.P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **58**, 719-726 (1967).
 65. Tyagi,S. & Kramer,F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**, 303-308 (1996).
 66. Rozen,S. & Skaletsky,H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**, 365-386 (2000).
 67. Zuker,M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415 (2003).
 68. Altschul,S.F., Boguski,M.S., Gish,W., & Wootton,J.C. Issues in searching molecular sequence databases. *Nat. Genet.* **6**, 119-129 (1994).
 69. Kellogg,D.E., Sninsky,J.J., & Kwok,S. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **189**, 202-208 (1990).
 70. Belotserkovskii,B.P. & Johnston,B.H. Polypropylene tube surfaces may induce denaturation and multimerization of DNA. *Science* **271**, 222-223 (1996).
 71. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., New York . 1989.
 72. Sharp,P.A., Sugden,B., & Sambrook,J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-3063 (1973).
 73. Miller, J. H. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York . 1972.
 74. Calvin,N.M. & Hanawalt,P.C. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**, 2796-2801 (1988).
 75. Dower,W.J., Miller,J.F., & Ragsdale,C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145 (1988).
 76. Zabarovsky,E.R. & Winberg,G. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5912 (1990).
 77. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
 78. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
 79. Towbin,H., Staehelin,T., & Gordon,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354 (1979).
 80. Gershoni,J.M. & Palade,G.E. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* **124**, 396-405 (1982).

81. Burnette, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203 (1981).
82. Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J., & Thorpe, G.H. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **25**, 1531-1546 (1979).
83. Johnstone, A. and Thorpe, R. *Immunochemistry in Practice*. Blackwell Science Publications . 1982.
84. Kaufmann, S.H., Ewing, C.M., & Shaper, J.H. The erasable Western blot. *Anal. Biochem.* **161**, 89-95 (1987).
85. Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Fritz, J.M., Meijer, C.J., Scheper, R.J., & Zaman, G.J. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **54**, 4557-4563 (1994).
86. Hipfner, D.R., Gauldie, S.D., Deeley, R.G., & Cole, S.P. Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **54**, 5788-5792 (1994).
87. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., & Borst, P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **57**, 3537-3547 (1997).
88. Scheffer, G.L., Hu, X., Pijnenborg, A.C., Wijnholds, J., Bergen, A.A., & Scheper, R.J. MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab Invest* **82**, 515-518 (2002).
89. Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., & Ling, V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* **316**, 820-823 (1985).
90. Georges, E., Bradley, G., Garipey, J., & Ling, V. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 152-156 (1990).
91. Scheffer, G.L., Kool, M., Heijn, M., de Haas, M., Pijnenborg, A.C., Wijnholds, J., van Helvoort, A., de Jong, M.C., Hooijberg, J.H., Mol, C.A., van der, L.M., de Vree, J.M., van, d., V, Elferink, R.P., Borst, P., & Scheper, R.J. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **60**, 5269-5277 (2000).
92. Byrne, J.A., Strautnieks, S.S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C.F., Linton, K.J., & Thompson, R.J. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**, 1649-1658 (2002).
93. Kullak-Ublick, G.A., Glasa, J., Boker, C., Oswald, M., Grutzner, U., Hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J., Beuers, U., Kramer, W., Wess, G., & Paumgartner, G. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* **113**, 1295-1305 (1997).
94. Hoover, K.B., Liao, S.Y., & Bryant, P.J. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am. J. Pathol.* **153**, 1767-1773 (1998).
95. Tsarfaty, I., Rong, S., Resau, J.H., Rulong, S., da Silva, P.P., & Vande Woude, G.F. The Met proto-oncogene mesenchymal to epithelial cell conversion. *Science* **263**, 98-101 (1994).
96. Ramachandran, C. & Melnick, S.J. Multidrug resistance in human tumors--molecular diagnosis and clinical significance. *Mol. Diagn.* **4**, 81-94 (1999).
97. Desjardin, L.E., Perkins, M.D., Wolski, K., Haun, S., Teixeira, L., Chen, Y., Johnson, J.L., Ellner, J.J., Dietze, R., Bates, J., Cave, M.D., & Eisenach, K.D. Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis

- messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **160**, 203-210 (1999).
98. Fairman,J., Roche,L., Pieslak,I., Lay,M., Corson,S., Fox,E., Luong,C., Koe,G., Lemos,B., Grove,R., Fradkin,L., & Vernachio,J. Quantitative RT-PCR to evaluate in vivo expression of multiple transgenes using a common intron. *Biotechniques* **27**, 566-4 (1999).
 99. Bustin,S.A. & Dorudi,S. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Mol. Med. Today* **4**, 389-396 (1998).
 100. Ghossein,R.A. & Rosai,J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* **78**, 10-16 (1996).
 101. Hill,W.E. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 123-173 (1996).
 102. Holodniy,M. Clinical application of reverse transcription-polymerase chain reaction for HIV infection. *Clin. Lab Med.* **14**, 335-349 (1994).
 103. Bucher,P. Regulatory elements and expression profiles. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 400-407 (1999).
 104. Wang,T. & Brown,M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* **269**, 198-201 (1999).
 105. Freeman,W.M., Walker,S.J., & Vrana,K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**, 112-115 (1999).
 106. Buell,G.N., Wickens,M.P., Payvar,F., & Schimke,R.T. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J. Biol. Chem.* **253**, 2471-2482 (1978).
 107. Shimomaye,E. & Salvato,M. Use of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase at high temperature for sequence analysis of highly structured RNA. *Gene Anal. Tech.* **6**, 25-28 (1989).
 108. Suzuki,T., Higgins,P.J., & Crawford,D.R. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* **29**, 332-337 (2000).
 109. Biragyn,A., Arkins,S., & Kelley,K.W. Riboprobe expression cassettes for measuring IGF-I, beta-actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase transcripts. *J. Immunol. Methods* **168**, 235-244 (1994).
 110. Perfetti,V., Manenti,G., & Dragani,T.A. Expression of housekeeping genes in Hodgkin's disease lymph nodes. *Leukemia* **5**, 1110-1112 (1991).
 111. Zollner,G., Fickert,P., Silbert,D., Fuchsbichler,A., Marschall,H.U., Zatloukal,K., Denk,H., & Trauner,M. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* **38**, 717-727 (2003).
 112. Zollner,G., Fickert,P., Zenz,R., Fuchsbichler,A., Stumptner,C., Kenner,L., Ferenci,P., Stauber,R.E., Krejs,G.J., Denk,H., Zatloukal,K., & Trauner,M. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**, 633-646 (2001).
 113. Kojima,H., Nies,A.T., Konig,J., Hagmann,W., Spring,H., Uemura,M., Fukui,H., & Keppler,D. Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* **39**, 693-702 (2003).
 114. Ros,J.E., Libbrecht,L., Geuken,M., Jansen,P.L., & Roskams,T.A. High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J. Pathol.* **200**, 553-560 (2003).

115. Pauli-Magnus,C., Kerb,R., Fattinger,K., Lang,T., Anwald,B., Kullak-Ublick,G.A., Beuers,U., & Meier,P.J. BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **39**, 779-791 (2004).
116. Michalski,C., Cui,Y., Nies,A.T., Nuessler,A.K., Neuhaus,P., Zanger,U.M., Klein,K., Eichelbaum,M., Keppler,D., & Konig,J. A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J. Biol. Chem.* **277**, 43058-43063 (2002).
117. Li,D., Zimmerman,T.L., Thevananther,S., Lee,H.Y., Kurie,J.M., & Karpen,S.J. Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J. Biol. Chem.* **277**, 31416-31422 (2002).
118. Staudinger,J.L., Madan,A., Carol,K.M., & Parkinson,A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos.* **31**, 523-527 (2003).
119. Kast,H.R., Goodwin,B., Tarr,P.T., Jones,S.A., Anisfeld,A.M., Stoltz,C.M., Tontonoz,P., Kliewer,S., Willson,T.M., & Edwards,P.A. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 2908-2915 (2002).
120. Jung,D., Hagenbuch,B., Gresh,L., Pontoglio,M., Meier,P.J., & Kullak-Ublick,G.A. Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* **276**, 37206-37214 (2001).
121. Kikuchi,S., Hata,M., Fukumoto,K., Yamane,Y., Matsui,T., Tamura,A., Yonemura,S., Yamagishi,H., Keppler,D., Tsukita,S., & Tsukita,S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat. Genet.* **31**, 320-325 (2002).
122. Kipp,H. & Arias,I.M. Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin. Liver Dis.* **20**, 339-351 (2000).
123. Roelofsen,H., Soroka,C.J., Keppler,D., & Boyer,J.L. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 8)**, 1137-1145 (1998).
124. Misra,S., Ujhazy,P., Varticovski,L., & Arias,I.M. Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5814-5819 (1999).
125. Beuers,U., Bilzer,M., Chittattu,A., Kullak-Ublick,G.A., Keppler,D., Paumgartner,G., & Dombrowski,F. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* **33**, 1206-1216 (2001).
126. Kurz,A.K., Graf,D., Schmitt,M., Vom,D.S., & Haussinger,D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* **121**, 407-419 (2001).
127. Dombrowski,F., Kubitz,R., Chittattu,A., Wettstein,M., Saha,N., & Haussinger,D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **348 Pt 1**, 183-188 (2000).
128. Rost,D., Kartenbeck,J., & Keppler,D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* **29**, 814-821 (1999).

-
129. Mottino,A.D., Cao,J., Veggi,L.M., Crocenzi,F., Roma,M.G., & Vore,M. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* **35**, 1409-1419 (2002).
 130. Paumgartner,G. & Beuers,U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* **36**, 525-531 (2002).
 131. Hauser,I.A., Koziolk,M., Hopfer,U., & Thevenod,F. Therapeutic concentrations of cyclosporine A, but not FK506, increase P-glycoprotein expression in endothelial and renal tubule cells. *Kidney Int.* **54**, 1139-1149 (1998).
 132. Geick,A., Eichelbaum,M., & Burk,O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14581-14587 (2001).
 133. Laplante,A., Demeule,M., Murphy,G.F., & Beliveau,R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp. *Transplant. Proc.* **34**, 3393-3395 (2002).
 134. Roman,I.D., Fernandez-Moreno,M.D., Fueyo,J.A., Roma,M.G., & Coleman,R. Cyclosporin A induced internalization of the bile salt export pump in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Sci.* **71**, 276-281 (2003).
 135. Goh,L.B., Spears,K.J., Yao,D., Ayrton,A., Morgan,P., Roland,W.C., & Friedberg,T. Endogenous drug transporters in in vitro and in vivo models for the prediction of drug disposition in man. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1569-1578 (2002).
 136. Guo,A., Marinaro,W., Hu,P., & Sinko,P.J. Delineating the contribution of secretory transporters in the efflux of etoposide using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells overexpressing P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance-associated protein (MRP1), and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT). *Drug Metab Dispos.* **30**, 457-463 (2002).
 137. Cereijido,M., Robbins,E.S., Dolan,W.J., Rotunno,C.A., & Sabatini,D.D. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* **77**, 853-880 (1978).
 138. Braun,A., Hammerle,S., Suda,K., Rothen-Rutishauser,B., Gunthert,M., Kramer,S.D., & Wunderli-Allenspach,H. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11 Suppl 2**, S51-S60 (2000).
 139. Irvine,J.D., Takahashi,L., Lockhart,K., Cheong,J., Tolan,J.W., Selick,H.E., & Grove,J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* **88**, 28-33 (1999).
 140. Paine,M.F., Leung,L.Y., Lim,H.K., Liao,K., Oganessian,A., Zhang,M.Y., Thummel,K.E., & Watkins,P.B. Identification of a novel route of extraction of sirolimus in human small intestine: roles of metabolism and secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 174-186 (2002).
 141. Schwab,D., Fischer,H., Tabatabaei,A., Poli,S., & Huwyler,J. Comparison of in vitro P-glycoprotein screening assays: recommendations for their use in drug discovery. *J. Med. Chem.* **46**, 1716-1725 (2003).
 142. Saeki,T., Ueda,K., Tanigawara,Y., Hori,R., & Komano,T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080 (1993).
 143. Leier,I., Jedlitschky,G., Buchholz,U., Cole,S.P., Deeley,R.G., & Keppler,D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**, 27807-27810 (1994).

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Ivo Meier-Wiedenbach
geboren am 03.10.1968 in Hannover
ledig

SCHULAUSBILDUNG

1975 -1979 Grundschule in Hannover
1979 -1981 Orientierungsstufe in Hannover
1981 -1990 Gymnasium in Hannover

ERSATZDIENST

1991 -1992 Abdominal- und Transplantationschirurgie
(Station 12),
Medizinische Hochschule Hannover

HOCHSCHULAUSBILDUNG

1990 -1991 Sozialwissenschaftsstudium an der Universität
Hannover
1992 -1999 Biologiestudium an der Universität Hannover
1998 -1999 Diplomarbeit am Institut für Medizinische
Mikrobiologie in der Medizinischen Hochschule
Hannover
Titel: „Molekulare Analyse des C3a-Rezeptordefekts
im Meerschweinchen Inzuchtstamm C2BB/R⁽⁻⁾“

PROMOTION

2001 -2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
an der Medizinischen Hochschule Hannover
Direktor: Prof. Dr. M. P. Manns
Promotion zum Thema: „Einfluss von cholestatischen
Lebererkrankungen und Immunsuppressiva auf die
molekulare Expression und Funktion hepatobiliärer
Transporter“

Die Dissertation

„Einfluss von cholestatischen Lebererkrankungen und Immunsuppressiva auf die molekulare Expression und Funktion hepatobiliärer Transporter“

wurde in der Zeit von März 2001 bis August 2004 in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durchgeführt habe. Die Ergebnisse sind nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden.

Hannover, den 24.08.2004